Aus der Medizinischen Klinik in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. G.A. Martini

METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR RADIOIMMUNOLOGISCHEN STEROIDBESTIMMUNG

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von

CHRISTA HAGEN-AUKAMP, geb. Hagen
aus Limburg an der Lahn

Marburg 1979

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus der Medizinischen Klinik in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. G.A. Martini

METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR RADIOIMMUNOLOGISCHEN STEROIDBESTIMMUNG

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von

CHRISTA HAGEN-AUKAMP, geb. Hagen

aus Limburg an der Lahn

Marburg 1979

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 14. September 1979

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. F. Neurath
Referent: Prof. Dr. med. H. Gerdes
Correferent: Prof. Dr. med. H.-G. Knauff

Meinen Eltern gewidmet

Abkürzungen

1. RIA = Radioimmunoassay
2. BSA = Bovine-serum-albumin
3. DHT = Dihydrotestosteron
4. AK = Antikörper
5. T = Testosteron
6. CPG = Controlled-Pore-Glass

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. ALLGEMEINER TEIL 1

I. Prinzip und allgemeine Voraussetzungen der radioimmunologischen Steroidbestimmung 1

1. Steroidantigensynthese, Immunisierung und Charakterisierung von Steroidantikörpern 4

2. Radioaktivität 9

3. Vorbereitung des biologischen Materials vor dem RIA; Trennung der freien und gebundenen Steroidfraktion; Zuverlässigkeitskriterien der radioimmunologischen Bestimmung 10

B. EXPERIMENTELLER TEIL 13

I. Untersuchungen zur Antikörperherstellung gegen androgene Steroide 13

1. Der Einfluß von drei verschiedenen Kupplungsarten des Testosterons an Rinder Serum Albumin bei der Antigensynthese auf Spezifität und Titer der erhaltenen Testosteronantikörper 13

a. Die Synthese von Testosteron-Glycin-Hydrazid-BSA 13

b. Die Synthese von Testosteron-Hemisuccinat-BSA 14

c. Die Synthese von Testosteron-7-carboxy-äthylthioäther-BSA 14

Seite

d. Immunisierung und Charakterisierung der Antikörper 14

e. Ergebnisse und Diskussion 15

2. Die Herstellung von Antikörper gegen 5-α-Dihydrotestosteron-BSA (direkte Kupplung des Steroids an Rinder-Serum-Albumin) 18

3. Die Verwendung des Antiserums gegen 5-α- Dihydrotestosteron-BSA zur Bestimmung von 3ß-Androstandiol 20

II. Untersuchungen zur Extraktion der Androgene aus Plasma mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln 23

1. Problemstellung 23

2. Versuchsdurchführung 23

3. Ergebnis und Diskussion 24

III. Untersuchungen zur chromatographischen Trennung von Androgenen mit Mikrosäulen 26

A. Dünnschichtchromatographische Trennung von Steroiden 26

B. Die Trennung von Steroiden an einer Mikrosäule 28

1. Herstellung einer Kieselgel-Mikrosäule für den Radioimmunoassay 28

2. Das direkte Auftragen des organischen Extraktionsmittels auf die Kieselgelsäule 30

Seite

a. Versuchsdurchführung 31

b. Ergebnis und Diskussion 31

3. Vergleich des direkten Auftragens von Androgenen in den Extraktionsmitteln Dichlormethan und Diäthyläther (ohne vorheriges Eindampfen) 34

a. Versuchsdurchführung 34

b. Ergebnis und Diskussion 35

4. Der Einfluß der Elution einer Kieselgelsäule durch Lösungsmittel verschiedener Polarität auf den Blankwert im RIA 35

a. Versuchsdurchführung 37

b. Ergebnis und Diskussion 37

C. Die erstmalige Verwendung von porösem Glas zur Chromatographie von androgenen Steroiden und seine Verwendung im RIA 40

1. Problemstellung 40

2. Material 40

3. Versuchsdurchführung 41

a. Herstellung einer Mikrosäule 41

4. Ergebnis und Diskussion 41

a. Trennung von Androgenen mit einer Mikrosäule mit Controlled-Pore-Glass CPG-10 41

Seite

b. Einfluß verschiedener Porengrößen bei gleicher Korngröße auf die Steroidbestimmung 42

c. Einfluß verschiedener Korngrößen bei gleicher Porengröße auf die Steroidtrennung 44

d. Einfluß der Polarität des Elutionsmittels und der Säulenlänge auf die Trennung der Steroide an einer Mikrosäule mit porösem Glas 45

e. Die Untersuchung weiterer Elutionsmittelgemische zur Säulenchromatographie mit CPG-10 47

f. Der Einfluß des direkten Auftragens des Extraktionsmittels mit den aus Plasma extrahierten Steroiden (ohne vorherige Reduktion des organischen Extraktionsvolumens durch Eindampfen) auf eine Mikrosäule mit CPG-10 auf die Trennung der Steroide 47

g. Verwendung verschiedener Extraktionsmittel bei direkter Aufgabe auf eine Mikrosäule aus porösem Glas 51

h. Mehrmaliges Benutzen einer Mikrosäule aus porösem Glas (CPG-10) 55

i. Trennung von 3-α- und 3ß-Androstan-17-diol an einer Mikrosäule mit porösem Glas (CPG-10) 57

k. Der unspezifische Blank von Controlled-Pore-Glass bei der radioimmunologischen Steroidbestimmung 59

Seite

IV. Untersuchungen zur Trennmethode der antikörpergebundenen und freien Testosteronfraktion 62

1. Die Fällung von antikörpergebundenem Testosteron durch Polyethylenglycollösungen verschiedener Konzentrationen 62

a. Versuchsdurchführung 62

b. Ergebnis und Diskussion 63

2. Die Fällung von antikörpergebundenem Testosteron durch eine 30 %-ige Polyethylenglycollösung in Abhängigkeit vom Proteingehalt der Inkubationslösung 63

a. Versuchsdurchführung 63

b. Ergebnis und Diskussion 65

3. Der Einfluß der Trennmethode der antikörpergebundenen und freien Testosteron-Fraktion auf die Eichkurve bei der radioimmunologischen Steroidbestimmung 66

a. Versuchsdurchführung 66

b. Ergebnis und Diskussion 66

4. Der Einfluß der Trennmethode der antikörpergebundenen und freien Testosteron-Fraktion auf den Titer des Antiserums 68

a. Versuchsdurchführung 68

b. Ergebnis und Diskussion 69

5. Methodische Streuung der Ergebnisse der Messung der antikörpergebundenen Fraktion bei Verwendung von Charcoal-Dextran, Polyethylenglycoll und Ammoniumsulfat zur Trennung der gebundenen und freien Fraktion 71

a. Versuchsdurchführung 71

b. Ergebnis und Diskussion 71

6. Stabilität der antikörpergebundenen und freien Testosteronfraktion im RIA in Abhängigkeit von der Dauer der Einwirkung von Kohle, Polyethylenglycoll oder Ammoniumsulfat bei der Trennung der gebundenen und freien Fraktion 72

a. Versuchsdurchführung 72

b. Ergebnis und Diskussion 73

7. Die Stabilität der antikörpergebundenen Testosteronfraktion nach Abzentrifugieren mit Charcoal-Dextran 74

a. Versuchsdurchführung 74

b. Ergebnis und Diskussion 76

8. Einfluß der Temperatur auf die Trennung der antikörpergebundenen und freien Testosteronfraktion durch Charcoal-Dextran 76

a. Versuchsdurchführung 76

b. Ergebnis und Diskussion 77

9. Der Einfluß der Dextrankonzentration auf die Stabilität der Testosteron-Antikörper-Bindung 77

a. Versuchsdurchführung 77

b. Ergebnis und Diskussion 78

Seite

V. Untersuchungen zur unspezifischen Bindung von Testosteron an verschiedene Proteine 79

1. Vergleich der unspezifischen Bindung von Testosteron an verschiedene Proteine 79

a. Versuchsdurchführung 79

b. Ergebnis und Diskussion 80

2. Vergleich der unspezifischen Bindung an γ-Globulin vom Rind bei Verwendung der Präparate verschiedener Firmen 80

a. Versuchsdurchführung 82

b. Ergebnis und Diskussion 82

3. Der Einfluß des bei der radioimmunologischen Inkubation zugesetzten Proteins und der Trennmethoden mit Charcoal-Dextran, Polyethylenglycoll und Ammoniumsulfat auf die Testosteroneichkurve 84

a. Versuchsdurchführung 84

b. Ergebnis und Diskussion 85

4. Die Bindung von Testosteron und 5-α-Dihydrotestosteron an γ-Globulin vom Rind, Albumin und Lysozym 87

C. ZUSAMMENFASSUNG 89

LITERATURVERZEICHNIS 96

A. Allgemeiner Teil

I. Prinzip und allgemeine Voraussetzung der radioimmunologischen Steroidbestimmung

Im Jahre 1959 erschien die klassische Arbeit von Berson und Yalow (1) über die radioimmunologische Bestimmung von Plasma-Insulin. Zu diesem Zeitpunkt gab es bereits Publikationen über die Herstellung von spezifischen Antikörpern gegen Steroide (2-5). Aus einer Übersicht über den RIA aus dem Jahre 1968 geht hervor, daß alle Voraussetzungen zur Durchführung des RIA bereits 10 Jahre bevor der erste RIA für Steroide (6, 7) beschrieben wurde zur Verfügung standen, denn der RIA für Proteohormone war bereits seit dieser Zeit im Gebrauch.

Seit 1970 wurde die Anwendung des RIA für Steroide weiter ausgebaut und ist heute eine der empfindlichsten und spezifischsten Analysenverfahren. Mit dieser Bestimmungsmethode kann man Substanzmengen im Bereich von Pikogramm (1 pg = 10^{-12}g) quantitativ nachweisen (8). Die radioimmunologische Bestimmung basiert auf dem Prinzip, daß radioaktive Liganden mit einer hohen Affinität in begrenzter Menge an ein Protein gebunden werden können,aber durch nicht radioaktive Liganden aus der Bindung verdrängt werden. Im Unterschied zur unspezifischen Bindung besitzen die Proteine, die einen Liganden spezifisch binden eine begrenzte Kapazität, so daß die Bindungsstellen schnell abgesättigt werden können. Das methodische Prinzip des RIA der Steroidbestimmung ist folgendes: In einem Bestimmungsansatz reagiert eine limitierte Menge eines radioaktiv markierten Steroids mit dem Antikörper. Die Menge des antikörpergebundenen radioaktiv markierten Hormons kann nach Abtrennung der nicht gebundenen Fraktion des radioaktiv

markierten Hormons gemessen werden. Bei Zugabe einer wachsenden Menge des zu bestimmenden inaktiven Hormons wird ein wachsender Anteil des an den Antikörper gebundenen radioaktiven Hormons durch Konkurrenz um die Bindungsplätze am Antikörper verdrängt. Nach Trennung der gebundenen von der freien Fraktion kann der von der Menge des zugegebenen inaktiven Hormons abhängige Betrag des gebundenen radioaktiven Hormons bestimmt werden und zur Herstellung einer Eichkurve benutzt werden. Die Bindung eines Steroids an den relativ spezifischen Antikörper beruht auf einer reversiblen Wechselwirkung durch Wasserstoffbrückenbildung und van der Waalschen Kräften. Aus dem Gezeigten gehen die grundsätzlichen Probleme hervor, die beim Aufbau der radioimmunologischen Steroidbestimmung zu lösen sind. Es muß erstens ein möglichst spezifischer Antikörper vorhanden sein, der nach Synthese eines Antigens, Immunisieren von Tieren und Charakterisierung des gewonnenen Serums, verwendet wird; zweitens ein reines radioaktives Steroid vorhanden sein, und es muß drittens eine biologische Probe soweit gereinigt werden, daß das zu bestimmende Steroid ohne Störung durch andere Substanzen gemessen werden kann (Abb. 1).

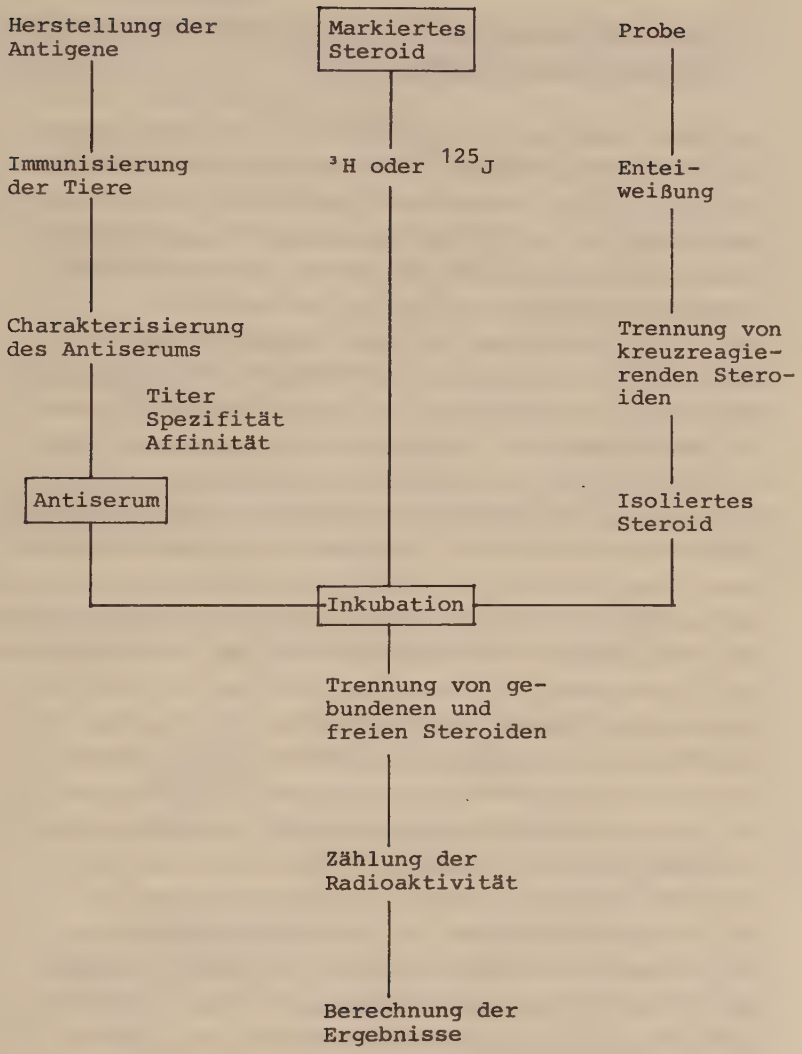

Abb. 1: Schematische Darstellung der Grundschritte des Radioimmunoassays für Steroide (9)

1. Steroidantigensynthese, Immunisierung und Charakterisierung von Steroidantikörper

Die Spezifität und Empfindlichkeit jeder radioimmunologischen Bestimmungsmethode hängt hauptsächlich von der Qualität des verwendeten Antikörpers ab, der sich durch eine hohe Affinität zum Antigen (Sensibilität), niedrige Kreuzreaktion (Spezifität) und Antikörpertiter (Antikörperkonzentration) auszeichnet.
Als Antigen bezeichnet man eine Substanz, die von einem spezifischen Antikörper gebunden wird. Wirkt ein Antigen als Immunogen, so löst dieses die Bildung des Antikörpers aus. Substanzen mit niedrigerem Molekulargewicht als 3 000 können zwar als Antigen vom Antikörper gebunden werden, wirken aber nicht immunogen. Landsteiner zeigte 1933, daß kleine Antigene, sog. Haptene, dann, wenn sie an Proteine kovalent gebunden sind, als Immunogene wirksam werden können. Steroide sind wegen ihres kleinen Molekulargewichtes als Reinsubstanzen nicht immunogen. Sie können aber als Hapten nach Bindung an ein Protein immunogen werden (2, 3). Die ersten brauchbaren Immunogene zur Gewinnung von Corticoid-Antisera wurden 1957 von Erlanger et al. synthetisiert (2). Sie kuppelten Testosteron-C-21-(O-Carboxymethyl)-Oxim und Cortison-21-Hemisuccinat mittels der "gemischten Anhydridmethode" als Hapten an Protein.
Bei der Antigensynthese ist für die Spezifität die Stelle besonders wichtig, an der das Steroid-Molekül an ein Protein gekuppelt werden soll. Man stellt heute hauptsächlich Steroid-Proteinverbindungen durch kovalente Bindung an verschiedene Kohlenstoffatome des Steroid-Moleküls her und versucht eine Maskierung der für das Steroid typischen funktionellen Gruppe durch direkte Kupplung zu vermeiden, denn dieses Antiserum hätte nur eine geringe Spezifität.
Wenn die Bindung zum Protein an einer Position am Cyclo-

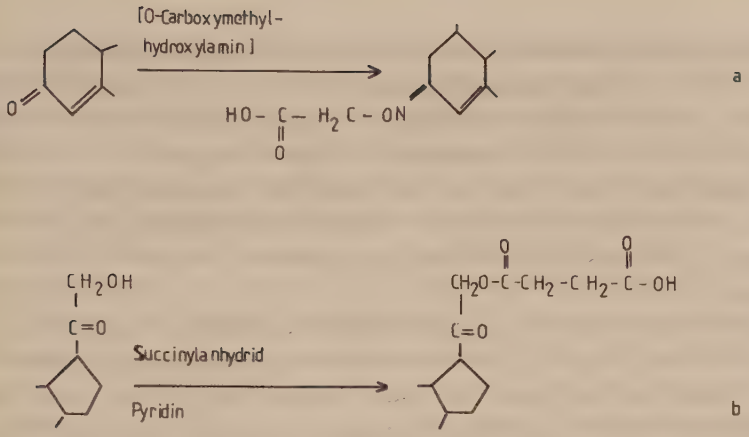

Abb. 2: Synthese von Steroid-C-3-Oxim (a) und von Steroid-C-21-Hemisuccinat Derivaten (b) (11)

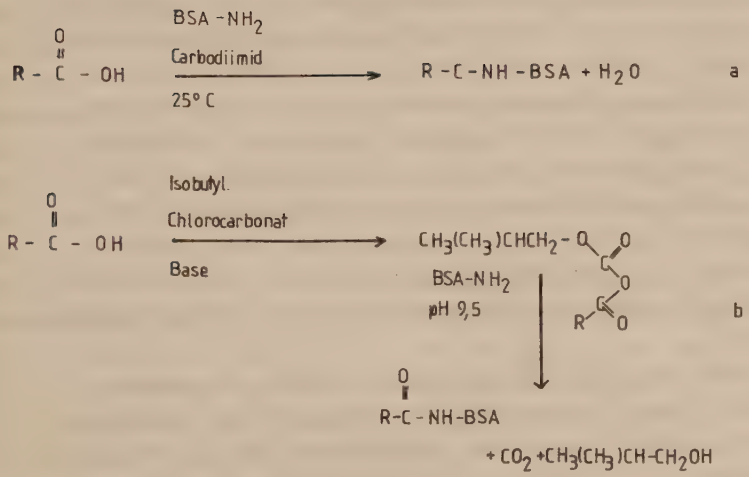

Abb. 3.: Kupplung von Steroidderivaten (R) an BSA a) Carbodiimidmethode b) gemischte Anhydridmethode (11)

pentanophenanthren-Kern des Steroids durchgeführt werden soll, die eine Hydroxylgruppe enthält, wird zunächst eine Zwischenverbindung als Hemisuccinat- oder Chlorcarbonat-Derivat hergestellt. Zur Konjugation an eine Ketogruppe wird ein Oxim-Derivat hergestellt (10). Die Derivate werden an Rinder-Serum-Albumin gekoppelt, welches das häufigste gebrauchte Carrier-Protein ist.

Zur Immunisierung sind verschiedene Tierspecies untersucht worden, so z. B. Meerschweinchen, Kaninchen, Schafe, Ziegen und gelegentlich auch Ratten und Hühner. Am häufigsten benutzt wurden Kaninchen, sie sind gute Antikörperbildner und einfach in der Pflege und der Gewinnung des Serums. Größere Tiere, z.B. Schafe haben den Vorteil, daß sie große Mengen von Antiserum produzieren, wenn sie einmal Antikörper gebildet haben, bringen aber andere Schwierigkeiten mit sich, besonders in der Tierhaltung. Ob bestimmte Species in der Lage sind, Antikörper mit höherer Spezifität, Affinität und Titer zu produzieren als andere Species, läßt sich auf Grund der vorliegenden Daten nicht eindeutig beantworten (11). Die Produktion von Antikörpern wird gefördert, wenn man das Immunogen zusammen mit einem sog. Adjuvans injiziert. Am häufigsten verwendet man das von Freund 1951 eingeführte Adjuvans. Es besteht aus einem Detergens (ArlacelA), Paraffinöl und getöteten Tuberkelbakterien. Durch die Mischung mit dem Immunogen entsteht durch das Detergens eine stabile Emulsion, die zum Immunisieren injiziert wird. Der Wirkungsmechanismus des Adjuvans ist noch nicht vollständig geklärt.

Zur Immunisierung injiziert man entweder intramuskulär, subcutan oder intracutan. In der Regel sind zu Beginn wöchentliche, später etwa vierwöchentliche Injektionen ausreichend um eine Antikörperbildung bei den Tieren anzuregen. Ist die Menge des verfügbaren Immunogens

nur begrenzt, so empfiehlt sich eine Immunisierung nach Vaitukaitis (12). Diese Technik besteht in einer intradermalen Injektion an 30 bis 50 Stellen mit kleinen Dosen der Mischung des Antigens mit komplettem Freund' schen Adjuvans. Bis heute gibt es kaum kritische Stellungnahmen darüber, welche Applikationsart die beste ist. Von praktischer Bedeutung ist der Einfluß der Immunisierungsdauer auf die Qualität der Antikörper. Haning, R. et al. (13) immunisierte Schafe mit Aldosteron-Protein-Komplexen und konnte zeigen, daß sowohl die Spezifität als auch der Titer bei nahezu allen Tieren mit längerer Immunisierungsdauer zunahm. In der Regel haben die Tiere nach drei bis sechs Monaten so große Antikörperkonzentrationen im Blut, daß das Serum zur radioimmunologischen Steroidbestimmung geeignet ist.

Zur Charakterisierung des Antikörpers stehen der Titer, die Affinität und die Spezifität zur Verfügung.

a) Unter dem Titer versteht man die Verdünnung eines Antiserums, bei der 50 % einer zu dem Inkubationsansatz gegebenen Radioaktivität gebunden wird (11). Da alle anderen Variablen des radioimmunologischen Inkubationsansatzes, die die Bindung des Liganden beeinflussen, bei dieser Titerdefinition nicht definiert sind, lassen sich nur Titer vergleichen, die unter voll standardisierten Bedingungen bestimmt worden sind. In der Regel lassen sich die Titer verschiedener Labors nicht vergleichen. Da der Titer einer Antikörperlösung gute Hinweise für die Herstellung der Eichkurve ergibt, hat sich die einfache Bestimmung des Titers trotz der mangelnden Definition in der Praxis nicht durch die Bestimmung der Affinitätskonstante verdrängen lassen, die eine exakt definierte Aussage über die Bindungsfähigkeit eines An-

tikörpers macht.

b) Die Affinitätskonstante für Anti-Steroid-Antikörper kann man berechnen durch die Scatchard Konstante (14) oder die Michaelis Menten Konstante (15).
Die Affinitätskonstante nach Michaelis Menten ist definiert als der Reziprokwert der nicht gebundenen molaren Konzentration bei Halb-Sättigung des gebundenen Antikörpers. Antiseren gegen Steroide sind heterogen und enthalten verschiedene Immunglobuline mit verschiedenen Konzentrationen, Affinität und Spezifität. Die Affinitätskonstante nach Michaelis Menten ist ein Durchschnittswert für die gesamte heterologe Population der Antikörperbindung mit dem größten K_m-Wert bei Verwendung der Charcoal-Dextran Methode, denn die Wahl der Trennmethode geht dabei mit ein.

c) Die Spezifität eines Antikörpers wird durch die Kreuzreaktion gekennzeichnet.
Die Kreuzreaktionen geben eine Aussage darüber, durch welche Stoffe und in welcher Größenordnung die Bindung des spezifischen Liganden mit dem Antikörper gestört werden kann. Für die radioimmunologische Steroidbestimmung sind die Kreuzreaktionen deshalb von entscheidender Bedeutung, weil sie Notwendigkeit und Ausmaß der chromatographischen Verunreinigung der zu messenden Substanz bestimmen. Die Kreuzreaktion ist definiert (16) als das Verhältnis der Menge des nicht radioaktiven Liganden, der 50 % einer definierten Menge des radioaktiven Liganden aus der Bindung mit dem spezifischen Antikörper verdrängt, zu der Menge der kreuzreagierenden Substanz, die ebenfalls 50 % des radioaktiven Liganden verdrängt (Kreuzreaktion = $\frac{x}{y}$ x 100 %). Da auf Grund des einfachen Moleküls Steroide keine große antigene Information besitzen, da weiterhin eine antigene reaktive Gruppe durch die Bindung an das Protein durch die Antigensynthese nicht zur Verfügung steht und da drittens

zahlreiche strukturell ähnliche Steroide in dem zu bestimmenden biologischen Material vorliegen können, ist die Spezifität der Antiseren häufig nicht so groß, daß eine radioimmunologische Bestimmung ohne Trennung des zu bestimmenden Steroids von kreuzreagierenden Substanzen durchgeführt werden kann. Da die chromatographische Vorreinigung die Praktikabilität der Bestimmungsmethode erheblich verschlechtert, ist versucht worden, durch unterschiedliche Kupplungsorte am Steroidmolekül und unterschiedliche Kupplungsarten die Spezifität des Haptens zu vergrößern (17, 18). Versuche, schnellere chromatographische Verfahren bei der radioimmunologischen Steroidbestimmung zu nutzen, sind kaum gemacht worden.

2. Radioaktivität

Die größten Vorteile des RIA liegen in seiner Spezifität und Sensibilität. Dabei wird die Spezifität des RIA bestimmt von der Spezifität des Antikörpers, die Sensibilität von der Affinität des Antikörpers und der Verwendung von Radioisotopen, die in kleinsten Substanzmengen noch meßbar sind.
Von der einzusetzenden radioaktiven Substanz, dem Tracer, fordert man eine hohe spezifische Radioaktivität (Zerfallsrate/Stoffmenge), denn je höher die spezifische Aktivität des Radionucleids, umso weniger Substanz benötigt man für den Test, denn je kleiner die Menge von radioaktiver und zu bestimmender Substanz um die Antikörperbindungsstellen konkurrieren, um so sensibler der Assay.
Man kann entweder ß- oder γ-emitierende radioaktive Steroide verwenden. Tritium markierte Verbindungen werden am häufigsten verwandt. Sie besitzen eine hohe Halbwertszeit. Sie ist in der Regel länger als ein Jahr.

Bei der Verwendung von ß-Strahlern ist man auf den Gebrauch eines Scintillationsmediums angewiesen, außerdem ist die ß-Zählung sehr kostspielig. Aus diesem Grunde wird heute von vielen Arbeitsgruppen die Verwendung von ɣ-Strahlern hauptsächlich radioaktiv markiertem Jod (^{125}J) neuerdings auch Selen (^{75}Se) bevorzugt.

3. Vorbereitung des biologischen Materials vor dem RIA; Trennung der freien und gebundenen Steroidfraktion; Zuverlässigkeitskriterien des Assays

Der Reinigungsgrad einer biologischen Probe vor dem RIA hängt von der Spezifität des Antiserums, der relativen Konzentration interferierender Steroide und von nicht spezifischen Interferenzen durch Plasmalipide und Proteine ab. Wenn es sich bei der Bestimmung um ein Steroid handelt, welches im Vergleich zum störenden Steroid in großen Konzentrationen in dem zu untersuchenden Material vorkommt, kann dieses Steroid ohne großen Fehler direkt aus der Probe bestimmt werden. Es sind mehrere direkte Bestimmungen beschrieben worden (19).
Ist das störende Steroid viel polarer oder unpolarer als das zu untersuchende, so kann das interferierende Steroid durch selektive Extraktion mit entsprechenden Lösungsmitteln entfernt werden. Man verwendet z.B. zur quantitativen Progesteron-Bestimmung eine solche selektive Extraktion ohne Chromatographie (20, 21). Außer dieser selektiven Lösungsmittelextraktion gibt es weitere nichtchromatographische Verfahren, die sich auf immunologische Reinigung (22, 23) oder Derivatisation (24) beziehen.
Zur chromatographischen Trennung stehen die verschiedensten Systeme zur Verfügung. Die am häufigsten benutzten sind:
Dünnschichtchromatographie auf Silica Gel oder Alu-

miniumoxid; Säulenchromatographie mit LH-Sephadex, Celite oder Aluminiumoxid sowie Papierchromatographie (25). Ob eine chromatographische Reinigung der Probe notwendig ist, wird in erster Linie durch die Spezifität des Antikörpers bestimmt. Ist eine chromatographische Trennung angezeigt, so sinkt die Praktikabilität des RIA und die Kosten steigen; andererseits ermöglicht sie, daß verschiedene Steroide einer Probe simultan aus einer Probe gemessen werden können.

Die Trennung der gebundenen und freien Steroide ist ein weiterer limitierender Faktor für die Anzahl der zu bestimmenden Proben. Die Verfahren lassen sich in drei Gruppen einteilen (Tab. 1). Einerseits kann man das freie Antigen (Radioaktivität) aus dem Reaktionsgemisch entfernen, hierzu gehört die Trennung mit Aktivkohle (26, 27), wobei das freie Hormon von der Kohle adsorbiert und anschließend abzentrifugiert wird, während der Antigen-Antikörperkomplex in Lösung bleibt. Andererseits läßt sich die eiweißgebundene Radioaktivität z.B. durch Fällung mit Ammoniumsulfat $(NH_3)_2 SO_4$ (28, 29) entfernen. Eine sehr spezifische Fällung des Antigen-Antikörperkomplexes ist mit Hilfe eines entsprechenden präzipitierenden Gamma-Globulin-Antikörpers, der sog. Doppel-Antikörper Technik (32) möglich. Eine spezielle Form ist die "Solide-Phase-Technik".

Zu den Zuverlässigkeitskriterien des RIA gehört vor allem die Empfindlichkeit des Assays. Man unterscheidet zwei Typen, die Empfindlichkeit der Standardkurve und die Gesamtempfindlichkeit. Die erste hängt von der Affinität des Antiserums, der Menge des Antikörpers und markiertem Tracer, dem Inkubationsvolumen und dem Fehler der Methode ab. Die Gesamtempfindlichkeit hängt von der oben beschriebenen Empfindlichkeit der Standardkurve, dem Blank-Wert des Assays und der Wiederfindung des Steroids nach der Reinigung ab.

I. Adsorption vom freien Hormon mit Ausschluß des AG-AK-Komplexes

1. Aktivkohle
2. Florisil
3. Fullers Erde
4. Talkum
5. Amberlit

II. Selektive Entfernung des AG-AK-Komplexes

1. Präzipitation mit Salzen oder Fraktionierung mit Lösungsmitteln (Dioxan, Toluol, Alkohol usw.)
2. Doppel-AK Technik
3. "Solid-Phase" Technik

III. Trennung durch verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten von freiem und gebundenem Hormon

1. Säulenchromatographie
2. Hochspannungs-Elektrophorese

Tab. 1: Methoden zur Trennung der gebundenen und freien Steroide (11)

B. Experimenteller Teil

I. Untersuchungen zur Antikörperherstellung gegen Androgene

1. Der Einfluß von drei verschiedenen Kupplungsarten des Testosterons an Rinderserumalbumin bei der Antigensynthese auf Spezifität und Titer der erhaltenen Testosteronantikörper

Ziel der Untersuchung war es festzustellen, wie verschiedene Methoden der Antigensynthese unter Verwendung unterschiedlicher reaktiver Gruppen des Testosteronmoleküls Titer und Spezifität der Testosteronantikörper beeinflussen und weitere methodisch einfache Alternativen der Antigensynthese zu entwickeln. Es wurden zwei bekannte Methoden zur Darstellung von Steroidkonjugaten (Hemisuccinatbindung und Thioätherbindung) nachgearbeitet und mit einer einfachen und milden neuen Alternative der Antikörpersynthese verglichen (Glycinhydrazidbindung).
Alle Antigensynthesen wurden von R. Müller - Phys.-Chem. Institut Bonn - durchgeführt. Die Immunisierung, Gewinnung und Charakterisierung der Antiseren wurde von uns durchgeführt.

a. Die Synthese von Testosteron-Glycinhydrazid-BSA

Die Hydrazide sind in der Steroidchemie gut untersucht und es lag nahe, diese Verbindungsklasse zur Antigensynthese zu benutzen. R. Müller (Physiol. Chem. Inst. Bonn) hat das Glycinhydrazid auf seine Eignung hin untersucht, als Bindungsglied zwischen Steroid und makromolekularem Träger zu dienen und hat die Antigensynthese für uns durchgeführt (31).

Dabei wurde zwischen Testosteron und Glycinhydrazid in saurer alkoholischer Lösung Testosteron-Glycinhydrazol gebildet, das mit wasserlöslichem Carbodiimid (32) an Rinderserumalbumin gekoppelt wurde. Der Kupplungsgrad betrug 5 - 9 Moleküle Steroid je Molekül Rinderserumalbumin.

b. Die Synthese von Testosteron-hemisuccinat-BSA (2)

Testosteron wurde in Toluol mit Bernsteinsäureanhydrid zu Testosteron-Hemisuccinat umgesetzt. Mit Carbodiimid erfolgte die Kupplung des Hemisuccinats an Rinderserumalbumin. Der Kupplungsgrad betrug etwa 25 Moleküle Steroid pro Molekül Rinderserumalbumin.

c. Die Synthese von Testosteron-7-carboxyäthyl-Thioäther-BSA

An 6-Δ-Dihydrotestosteron wurde Mercaptopropionsäure angelagert. Der entstandene Testosteron-7-carboxyäthylthioäther wurde mit Carbodiimid an Rinderserumalbumin gekuppelt. Der Kupplungsgrad betrug 12 Moleküle Steroid pro Molekül Rinderserumalbumin.

d. Immunisierung und Charakterisierung der Antikörper

Zur Gewinnung der Antikörper wurden 14 weibliche 2-3 Monate alte weiße Neuseelandkaninchen vier Monate lang mit den verschiedenen Testosteronkonjugaten, die in physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt und mit Freudschem Adjuvants vermischt waren, immunisiert. Neun Tiere der Gruppe a wurden nach dem Immunisierungsplan von Prof. Vecsei durch i.m. Injektionen behandelt (11). Fünf Tiere, die Gruppe b, in Anlehnung an den Immunisierungsplan von Pirke und Doerr durch je 10 bis 15 intra- und subcutane Injektionen behandelt (33).
Als Titer wurde die Verdünnung bezeichnet, bei der von

0,5 ml eines, mit 2 mg/ml γ-Globulin enthaltendem 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4), verdünnten Serums, 50 % einer Radioaktivitätsmenge von 10 000 cpm (1,2^{3}H)-Testosteron gebunden werden.

e. Ergebnisse und Diskussion

In beiden Gruppen mit verschiedener Immunisierungsart haben alle mit Testosteron-Glycinhydrazon-BSA und Testosteron-7-carboxyäthylthioäther-BSA behandelten Tiere einen guten Antikörpertiter entwickelt. Ohne damit eine statistisch abgesicherte Aussage machen zu wollen, ist aus der Tab. 2 zu sehen, daß nur eines von vier mit Testosteron-Hemisuccinat-BSA immunisierten Tiere einen höheren Titer entwickelt hat. Einen Unterschied in der Titerentwicklung bei beiden Modifikationen der Immunisierung konnten wir nicht erkennen.

Tiere		Antigen	Titer a	Titer b
a	b			
1	I	T-3-Glycinhydrazon-BSA	1: 8000	1: 2900
2	II	T-3-Glycinhydrazon-BSA	1:14000	1:14900
3	III	T-3-Glycinhydrazon-BSA	1:12000	1: 9100
4		T-17-Hemisuccinat-BSA	1: 700	
5		T-17-Hemisuccinat-BSA	1: 6500	
6		T-17-Hemisuccinat-BSA	1: 200	
7		T-17-Hemisuccinat-BSA	1: 100	
8	VIII	T-7-Carboxyaethylthio-aether-BSA	1:20000	1: 8800
9	IX	T-7-Carboxyaethylthio-aether-BSA	1:12000	1: 9500

Tab. 2: Antikörpertiter 4 Monate nach Beginn des Immunisierens
Synthesen: 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, R. Müller; 4, 5, B. Penke
Immunisierungsplan: a nach P. Vecsei
b nach K. Pirke

Wir haben weiterhin die Kreuzreaktionen der verschiedenen Antiseren festgestellt (Tab. 3). Beim Testosteron-glycinhydrazon-Antiserum ist der arithm. Mittelwert von drei Seren, beim Testosteron-7-carboxyäthylthioätherserum von zwei Seren aufgeführt, beim Testosteron-7-Hemisuccinat sind die Werte des Tieres mit dem höchsten Titer dargestellt.
Drei Feststellungen lassen sich daraus treffen:

1. Die Kreuzreaktionen des T-3-Glycinhydrazon-Antiserums liegen, wie erwartet - bei Vergleich mit in der Literatur angegebenen Werten (34) - in dem Bereich, wie er für T-3-Carboxyoxim-Antiserum gefunden wird. Das trifft auch für die Kreuzreaktion von 54 % für 5-α-Dihydrotestosteron zu.

2. Das Testosteron-17-Hemisuccinatserum zeigt insgesamt die beste Spezifität mit einer Kreuzreaktion von 22 % für 5-α-Dihydrotestosteron.

3. Die vielfach geäußerte Meinung, daß eine Nichtverwendung der 3-Keto- und 17ß-Hydroxy-Gruppe der Androgene zur Antigensynthese logischerweise eine Verbesserung der Spezifität bringe, können wir, wie sich bei den Testosteron-7-carboxyäthylthioätherantiseren zeigt, für Testosteron-7-Verbindungen nicht bestätigen, was sich insbesondere durch die Kreuzreaktion des 5-α-Dehydrotestosterons von 65 % zeigt.

	T-3-Glycinhydrazon ($\bar{x}$, n = 3)	T-17-Hemisuccinat (n = 1)	T-7-Thioaether ($\bar{x}$, n = 2)
Testosteron	100 %	100 %	100 %
5 α-Dihydrotestosteron	54	22	65
Androstendion	1,7	0,8	< 0,2
5 α-Andr.-3 α,17β-diol	3,0	< 0,2	2,0
Epitestosteron	0,3	< 0,2	< 0,2
5 α-Androstandion	0,5	< 0,2	< 0,2
Androsteron	< 0,2	< 0,2	< 0,2
DHEA	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Aetiocholanolon	< 0,2	< 0,2	< 0,2
5β-And.-3 α, 17β-diol	2,3	0,4	1,5
Δ 5-Andr.-3β, 17β-diol	5,6	0,4	1,6
Cortisol	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Oestradiol	< 0,02	< 0,02	< 0,02

Tab. 3: Spezifität der Antiseren gegen verschiedene Testosteronkonjugate (Bestimmung nach Abraham)

n = Anzahl der Antiseren

$\bar{x}$: arithm. Mittelwert der Anzahl der Seren

T-3-Glycinhydrazon Arbeitstiter 1:14900

T-17-Hemisuccinat Arbeitstiter 1: 6500

T-7-Carboxyaethylthioaether Arbeitstiter 1:20000

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß erstens die Synthese von Testosteron-glycinhydrazid eine einfache und in der Reaktionsbestimmung milde Alternative zu den bekannten Methoden darstellt. Eine Verbesserung der Spezifität hat sich nicht ergeben.
Zweitens haben wir beim Vergleich einer nur kleinen Tierzahl keinen eindeutigen Einfluß des Immunisierungsverfahrens auf die Titerbildung gefunden.
Drittens war in unserer Untersuchung die Antikörperbildung gegen Testosteron-Hemisuccinat-BSA bei vier von fünf Tieren ungenügend.

2. Die Herstellung von Antikörper gegen 5-α-Dihydrotestosteron-BSA (direkte Kupplung des Steroids an Rinder-Serum-Albumin)

Im Rahmen unserer gemeinsamen Versuche, einfache Methoden der Antigensynthese zu entwickeln ist es R. Müller (Physiol. Chem. Institut Bonn) gelungen, 5-α-DHT direkt an ein Protein zu binden (35). Bei den bisher verwendeten Methoden der Antigensynthese werden bei Verwendung der Carbonylgruppe mit Carboxymethylhydroxylamin, mit p-Hydrazino-benzoesäure oder mit Glycinhydrazid (31), reaktionsfähige Zwischenprodukte hergestellt, die dann in einem zweiten Reaktionsschritt an ein Protein gebunden werden. Bei dem von R. Müller entwickelten Verfahren wird die Carbonylgruppe des Steroids durch reduktive Aminierung unter milden Bedingungen in wässriger Lösung zur Bindung mit der NH_2-Gruppe des Lysins an Rinderserumalbumin benutzt. Das neue Syntheseverfahren wurde zuerst mit 5-α-DHT versucht. Wir haben drei Kaninchen mit dem von R. Müller synthetisierten Antigen, 5-α-Dihydrotestosteron-BSA, das einen Kupplungsgrad von 14 hatte, nach dem Schema von P. Vescei immunisiert (11).

Steroid	Tier 1	Tier 2	Tier 3
	%	%	%
Testosteron	62,2	44,2	54,5
5α-Dihydrotestosteron	100	100	100
5α-Androstan-3α,17ß-diol	21,1	10,4	8,0
5α-Androstan-3ß, 17ß-diol	20,8	22,8	23,2
Androsteron	<0,1	<0,1	<0,1
Δ 4-Androstendion	0,43	0,48	0,58
5α-Androstandion	0,83	0,65	0,85
Dihydroepiandrosteron	<0,1	<0,1	<0,1
Epiandrosteron	<0,1	<0,1	<0,1
Aetiocholanolon	<0,1	<0,1	<0,1
5ß-Dihydrotestosteron	3,2	2,6	7,0
5ß-Androstan-3α, 17ßdiol	<0,1	<0,1	<0,1
5ß-Androstan-3ß, 17ßdiol	0,6	0,6	1,5
5ß-Androstandion	<0,1	<0,1	<0,1
5α-Androsten-3ß, 17ß-diol	3,6	2,6	13,7
Cortisol	<0,1	<0,1	<0,1
17α-OH-Progesteron	<0,1	<0,1	<0,1

Tab. 4: Kreuzreaktionen dreier Antiseren gegen 5-α-Dihydrotestosteron-BSA (Bestimmung nach Abraham)

Tiere: Kaninchen
Immunisierungsplan: n. Vecsei
Immunisierungsdauer: 3 Monate

Ergebnis und Diskussion

Wie die Tab. 4 zeigt, entwickelten die drei immunisierten Tiere Antikörper gegen 5-α-DHT-BSA, die nach drei Monaten die aufgeführten Kreuzreaktionen zeigten. Sie liegen für Testosteron um 50 %, für 5-α-Androstan-3ß, 17ß-diol um 20 %, und für 5-α-Androstan-3α, 17ß-diol um 8 bis 20 %. Die relativ hohen Kreuzreaktionen für Androstandiole sind zu erwarten, da bei der reduktiven Aminierung sowohl 3ß- als auch 3-α-Aminoandrostanderivate entstehen.

3. Die Verwendung des Antiserums gegen 5-α-DHT-BSA zur Bestimmung von 3ß-Androstandiol

Wegen der mit etwa20% relativ hohen Kreuzreaktion von 3ß-Androstan-17ß-diol unseres Antiserums gegen 5-α-DHT-BSA war es von Interesse festzustellen, ob es zur radioimmunologischen Bestimmung von 3ß-Androstandiol geeignet ist, für dessen Bestimmung zu diesem Zeitpunkt noch keine radioimmunologische Methode beschrieben war.

Ergebnis und Diskussion

Wie die Tab. 5 zeigt, liegt der Titer des Serums für 5-α-Androstan-3ß, 17ß-diol bei zwei untersuchten Tieren so hoch wie für 5-α-DHT.

Rad. Steroid	Tier 1	Tier 2
5-α-Dihydrotestosteron	1:9000	1:4000
Testosteron	1:8550	1:2300
5-α-Androstan-3 ß, 17ßdiol	1:5900	1:1800
5-α-Androstan-3 ß, 17ßdiol	1:9300	1:3250

Tab. 5: Titer zweier Antiseren gegen 5-α-Dihydrotestosteron-BSA

(3 Monate nach Immunisierungsbeginn. Immunisierungsschema in Anlehnung an P. Vescei)

Die Abb. 4 zeigt die Eichkurve des Antiserums für die Bestimmung von 5-α-Androstan-3ß, 17ß-diol und 5-α-Androstan-3-α, 17ß-diol. Es zeigt sich, daß die Eichkurven eine geringere Empfindlichkeit haben als für 5-α-DHT, daß sie aber für die radioimmunologische von 3ß-Androstandiol-Bestimmung ausreichend sind.

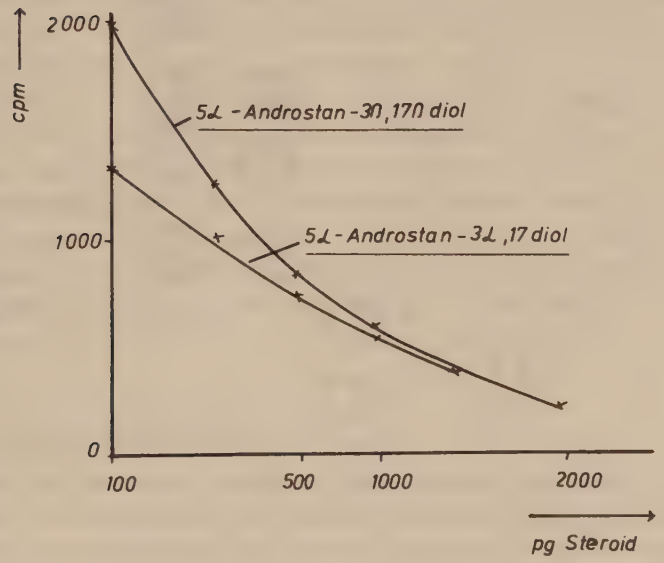

Abb. 4: Eichkurven für 5-α-Androstan-3-ß, 17-ß diol und 5-α-Androstan-3-α, 17ß diol.
AK gegen 5-α-DHT-BSA, Tier I-Arbeitstiter 1:9300

Aus der Spezifität der Antiseren ergibt sich, daß eine chromatographische Vorreinigung der Androstandiole notwendig ist. Zur chromatographischen Trennung von 5α-DHT, Testosteron, 3α-Androstandiol und 3ß-Androstandiol wurde von uns ein chromatographisches Verfahren mit einer Mikrosäule mit porösem Glas CPG-10, 200-400 mesh, 81 A und ein dünnschichtchromatographisches System auf Aluminiumoxid T entwickelt (Abb. 5).

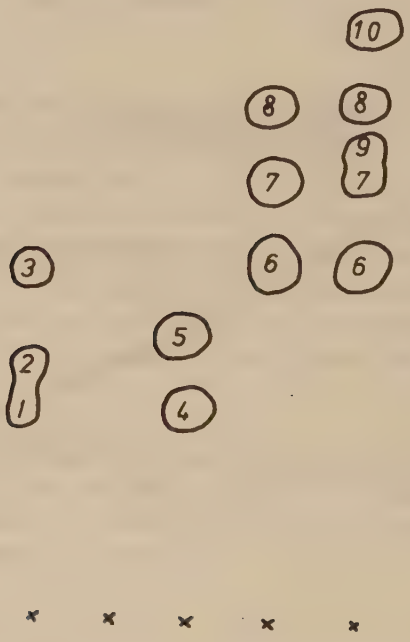

Abb. 5: Dünnschichtsystem zur Trennung von Androgenen auf Aluminiumoxid T
Laufmittel: Cumol/Aether/Aethylacetat
70 25 10
3 x gelaufen. AKT: 1 Std. bei 100° C.

		Rf-Wert			Rf-Wert
1	Epitestosteron	3,9 cm	6	Androsteron	6,7cm
2	Aetiocholanolon	4,8 cm	7	Epiandrosteron	8,3cm
3	Testosteron	6,6 cm	8	5-α-DHT	9,8cm
4	5-α-Androstan-3α, 17ß-diol	4,0 cm	9	Dihydroepiandr.	9,0cm
5	5-α-Androstan-3ß, 17ß-diol	5,4 cm	10	Epiaetiocholanol.	11,3cm

II. Untersuchungen zur Extraktion der Androgene aus dem Plasma mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln

1. Problemstellung

Bei den meisten Bestimmungsmethoden für Steroide aus Plasma ist es erforderlich, die freien und an Proteine gebundenen Steroide zuerst mit organischen Lösungsmitteln aus Plasma zu extrahieren. Bei der Auswahl eines geeigneten organischen Extraktionsmittels für Androgene suchten wir nach einem Extraktionsmittel, das alle uns interessierenden Androgene mit hoher Ausbeute extrahiert und direkt auf eine Mikrosäule, gefüllt mit Kieselgel oder porösem Glas, ohne vorherige Einengung aufgegeben werden kann. Wir haben das Extraktionsmittelgemisch Dichlormethan/Äther und reines Dichlormethan sowie das unpolare Hexan und ein Gemisch von Dichlormethan/Hexan untersucht. Die beiden Gemische hatten sich bei der Säulenchromatographie von Androgenen als gut geeignet erwiesen.

2. Versuchsdurchführung

In vier Spitzkolben wurden je eine definierte Menge der uns interessierenden radioaktiven Androgene gegeben und das Lösungsmittel dieser radioaktiven Standardlösung im Exsikkator unter Vakuum verdampft. Anschließend wurden 1,5 ml Plasma in die Spitzkolben pipettiert. Zur Herstellung eines Gleichgewichts zwischen dem radioaktiven Steroid und der freien und an Protein gebundenen Steroide wurden die Spitzkolben eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde in je einen Spitzkolben 25 ml Hexan, Dichlormethan, Diäthyläther oder Dichlormethan/Hexan 50/50 pipettiert. Nach

festem Verschluß der Spitzkolben mit Glasschliffstopfen wurden diese zur Extraktion 15 Minuten auf einem Schüttler (Köttermann) geschüttelt. Nach 10 min. Abzentrifugieren in einer Laborzentrifuge (Christ) bei 3000 U/Min., wurden die organischen Phasen in Spitzgläser abpipettiert und das Extraktionsmittel unter Stickstoff eingedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml Methanol gelöst und die Radioaktivität in einem Szintillationsmeßgerät im Packard gemessen. Die wiedergefundene Radioaktivität wurde als prozentualer Anteil der eingesetzten Radioaktivität berechnet.

3. Ergebnis und Diskussion

Wie die Tab. 6 zeigt, werden von Dichlormethan und Diäthyläther sowohl die unpolaren Androgene wie Androstendion als auch die polaren Androgene wie 3α- und 3ß-Androstandiol durch einmalige Extraktion mit einer gleichbleibenden Ausbeute zwischen 80 und 90 % extrahiert. Hexan dagegen extrahiert die unpolaren Androgene mit einer Ausbeute zwischen 45 und 60 %, die polaren Androgene einschließlich Testosteron zwischen 10 und 25 %. Die Extraktion mit Dichlormethan/Hexan 50/50 erbrachte eine Ausbeute zwischen 70 und 85 % für die unpolaren sowie die polaren Androgene und lag wenig unter der von Dichlormethan und Diäthyläther. Da sich bei der direkten Aufgabe des Extraktionsmittels auf die von uns verwendete Säule (Kieselgel Bio-Sil A; CPG-10, 200-400 mesh, gradipore glas) das Gemisch Dichlormethan/Hexan 50/50 am besten eignete, wurde es von uns bevorzugt verwendet.

	Hexan	Dichlormethan/Hexan 50 / 50	Dichlormethan	Diäthyläther
	%	%	%	%
3ß, 17ß-5α Androstandiol		77		
		66		
	11	49	75	86
	19	72	85	82
	22	77	79	88
Testosteron		83		
		84		
	23	91,3	87,5	85,1
3α, 17ß-5α Androstandiol	24	80,7	76	80
5α-DHT	46	82	77	82
	49	90	81,7	90,5
4-Androstendion	59,9	82,7	83,7	55,9
Dihydroepiandrosteron	59,6	88,8	88,8	83
Androsteron	61	83,5	-	81,6
Aetiocholanolon	-	77	-	-

Tab. 6: Extraktion von Steroiden aus Plasma mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln
(Zugabe einer Standardmenge des rad. Steroids dessen Extraktion zu untersuchen war. Extraktion mit 25 ml Dichlormethan/Hexan 50/50, Hexan, Dichlormethan oder Diäthyläther. Bestimmung des prozentualen Anteils der eingesetzten Radioaktivität)

III. Untersuchungen zur chromatographischen Trennung von Androgenen mit Mikrosäulen

A. Dünnschichtchromatographische Trennung von Steroiden

Da Kieselgeldünnschichtplatten und Kieselgelsäulen ein übereinstimmendes Trennverhalten für Steroide zeigen, die Lokalisation der Steroide leichter als bei Säulen ist, wurden dünnschichtchromatographische Vorversuche durchgeführt, um einen Überblick über das Laufverhalten verschiedener Steroide in verschiedenen Laufmittelsystemen zu gewinnen, oder um für schwierige Trennprobleme ein optimales Lösungsmittelgemisch zu finden. Verwendet wurden Polygram Sil G/254 Dünnschichtplatten ohne vorherige Aktivierung. In Methanol gelöste Steroide wurden (10 µg) am Start in der üblichen Weise aufgetragen und in einer meist zwei Stunden mit dem Laufmittel äquilibrierten Glaskammer ein oder mehrmals entwickelt. Die Sichtbarmachung der Steroide erfolgte durch Besprühen mit einem Reagens (Eisessig/konz. Schwefelsäure/ Anisaldehyd 97/2/1) und anschließendem Erwärmen auf 100° C für 5 Min. Bei der Säulenchromatographie wurden solche Lösungsmittel eingesetzt, die sich in den dünnschichtchromatographischen Vorversuchen in den Trennproblemen als optimal erwiesen hatten. Sie gleicht erwartungsgemäß dem Trennergebnis wie es durch das Laufmittel Benzol/Äthylacetat an Kieselgel erreicht wird (Tab. 7). Auch durch andere Elutionsmittel (Untersucht für Dichlormethan/Äther 99/1) ergibt sich eine vergleichbare Trennung.

Steroid	x
Cholesterin	9,5
Dehydroepiandrosteron	5,7
Androstendion	5,9
Androsteron	4,8
5-α-Dihydrotestosteron	5,7
Testosteron	2,7
Aetiocholanolon	3,0
5-α-Androstan-3-α, 17β diol	3,2
5-α-Androstan-3-β, 17β diol	3,6

Tab. 7: Die Trennung der wichtigsten Androgene auf einer Kieselgeldünnschichtplatte

x = Abstand in cm der einzelnen Steroide vom Start

10 µg der einzelnen Steroide (gelöst in 10 µl Methanol) wurde auf eine nicht aktivierte Kieselgeldünnschichtplatte (Polygram Sil G/UV 254) aufgetragen und dreimal in einem gesättigten Dünnschichttank mit Laufmittel Benzol/Äthylacetat 85/15 entwickelt. Die Sichtbarmachung der Steroide erfolgte durch Besprühen mit einem Eisessig/Schwefelsäure/Anisaldehydgemisch (98/2/1) und anschließendem 5 min. Erwärmen der Dünnschichtplatte im Trockenschrank bei 100° C. Die Steroide entwickeln sich dabei als Fleck mit einer charakteristischen Farbe für verschiedene Steroide.

B. Die Trennung von Steroiden an einer Kieselgel-Säule

Die für die radioimmunologische Steroidbestimmung zur Verfügung stehenden Antiseren sind zum Teil nicht so spezifisch, daß sie nur ein Steroid mit hoher Affinität binden und deshalb ohne vorherige Abtrennung von störenden, im Plasma vorhandenen Steroiden verwendet werden können. Die Abtrennung von Steroiden, die die Bestimmung stören, kann in geringem Ausmaß durch die Wahl eines Extraktionsmittels, daß das zu bestimmende Steroid in hoher Ausbeute, das störende Steroid in niedriger Ausbeute extrahiert, beeinflußt werden. Dieses Verfahren ist aber nur in wenigen Fällen möglich, so daß vor der radioimmunologischen Bestimmung ein chromatographisches Verfahren zur Abtrennung der unerwünschten Steroide eingesetzt werden muß. Es kommen dazu alle bekannten chromatographischen Verfahren in Betracht. Bei der Anwendung des Radioimmunoassays für Routinebestimmungen in der Klinik mit großem Probenanfall spielt die Praktikabilität des Verfahrens (Zeitaufwand) eine wesentliche Rolle. Unser Ziel war es nun zu untersuchen, ob es mit Hilfe einer - in Anlehnung an Hermandez (36) - weiterentwickelten kleinen Kieselgelsäule, die schnell herzustellen ist, und bei der das organische Extraktionsmittel ohne Eindampfen auf die Säule aufgegeben werden kann, möglich ist, ein chromatographisches Verfahren zu entwickeln, das bei Routinebestimmungen mit eingesetzt werden kann.

1. Herstellung einer Kieselgel-Mikrosäule für den Radioimmunoassay

Nach Vorversuchen haben wir eine Glassäule, wie sie in Abb. 6 dargestellt ist, für unsere Versuche benutzt. Als Säulenabschluß wurde auf einen, mit Methanol gereinigten, etwa 3 mm hohen Glaswollestopfen, ein Glas-

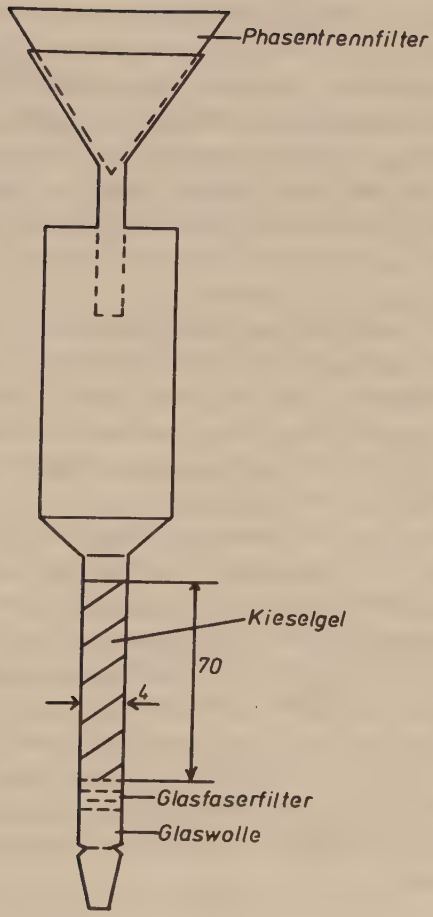

Abb. 6: Darstellung der verwendeten Mikrosäule

fiberfilter GF/F und zwei Glasfiberfilter GF/D aufgebracht. Das Kieselgel wurde in einem Becherglas in einem unpolaren Lösungsmittelgemisch suspendiert (meist mit Benzol/Äthylacetat 98/2 oder Hexan/Äthylacetat 98/2). Die Glassäule wurde zuerst mit dem zur Aufschwemmung benutzten Lösungsmittel gefüllt und die Kieselgelsuspension mit einer Pipette in die Glassäule gebracht um das Kieselgel gleichmäßig bis zur gewünschten Höhe sedimentieren zu lassen. Den oberen Säulenabschluß bildete ein Glasfiberfilter GF/D. Vor der Chromatographie wurde die Säule meist mit 5 bis 10 ml Benzol/Äthylacetat 98/2 eluiert.

In Vorversuchen wurden verschiedene käufliche Kieselgelsorten, die zum Teil noch durch Extraktion mit Aqua dest und Methanol von löslichen Substanzen gereinigt werden mußten, auf ihre Trennfähigkeit und auf die Größe des von ihnen verursachten unspezifischen Blanks im Radioimmunoassay untersucht.

Dabei hatte sich gezeigt, daß bei vergleichbaren Kieselgelsorten erhebliche Unterschiede in der chromatographischen Trennfähigkeit, wie auch in der Größe des Blanks vorlagen. Mittels Vorreinigung durch Aqua dest und Methanol ist es nicht gelungen, die Größe des Blanks wesentlich zu ändern. Auf Grund seiner guten Trennfähigkeit und seines niedrigen Blanks erwies sich das Kieselgel Bio-Sil A (Bio-Rad), 200-400 mesh, welches bereits kommerziell durch wässrige und organische Extraktion vorgereinigt ist, für unsere Problemstellung am besten geeignet.

2. Das direkte Auftragen des organischen Extraktionsmittels auf die Kieselgelsäule

Ziel der Untersuchung war es, herauszufinden, ob das organische Extraktionsmittel von 25 ml ohne Volumeneinengung auf eine Kieselgelsäule aufgetragen werden kann

und ob das direkte Auftragen des Extraktionsmittels die anschließende chromatographische Trennung negativ beeinflußt.

a. Versuchsdurchführung

In einem ersten Versuch wurde eine Standardmenge (1,2^3 H) - Testosteron in 0,1 ml Dichlormethan gelöst und direkt auf die Säule aufgetragen. In einem zweiten Versuch wurde eine Standardmenge (1,2^3 H)-Testosteron in 25 ml Dichlormethan gelöst und in diesem Volumen über einen Phasentrennfilter auf die Säule aufgetragen. In einem dritten Versuch wurde eine Standardmenge (1,2^{3}H)-Testosteron und (1,2^{3}H)-Dihydrotestosteron gemeinsam in 25 ml Dichlormethan gelöst und über einen Phasentrennfilter auf die Säule aufgetragen. In einem vierten Versuch wurde eine Standardmenge von (1,2^{3}H)-Testosteron und (1,2^{3}H)-Dihydrotestosteron in einem Spitzkolben zuerst in 2 ml Serum gelöst und dann mit 25 ml Dichlormethan extrahiert. Das Auftragen auf die Säule erfolgte über einen Phasentrennfilter. In einem fünften Versuch wurden Standardmengen von (1,2^{3}H)-Testosteron und (1,2^{3}H)-Dihydrotestosteron in einem Spitzkolben in 2 ml Serum gelöst und mit 25 ml Dichlormethan/Hexan 50/50 extrahiert. Das Extraktionsmittel wurde über einen Phasentrennfilter auf die Säule aufgegeben. Die chromatographische Trennung erfolgte immer durch Elution mit Benzol/Äthylacetat 90/10. Es wurden 3 ml-Fraktionen aufgefangen und die Radioaktivität eines 0,5 ml Aliquots gemessen.

b. Ergebnis und Diskussion

Wie die Abb. 7 zeigt, hat das Auftragen des radioaktiven Testosterons in 0,1 ml Dichlormethan bzw. 25 ml

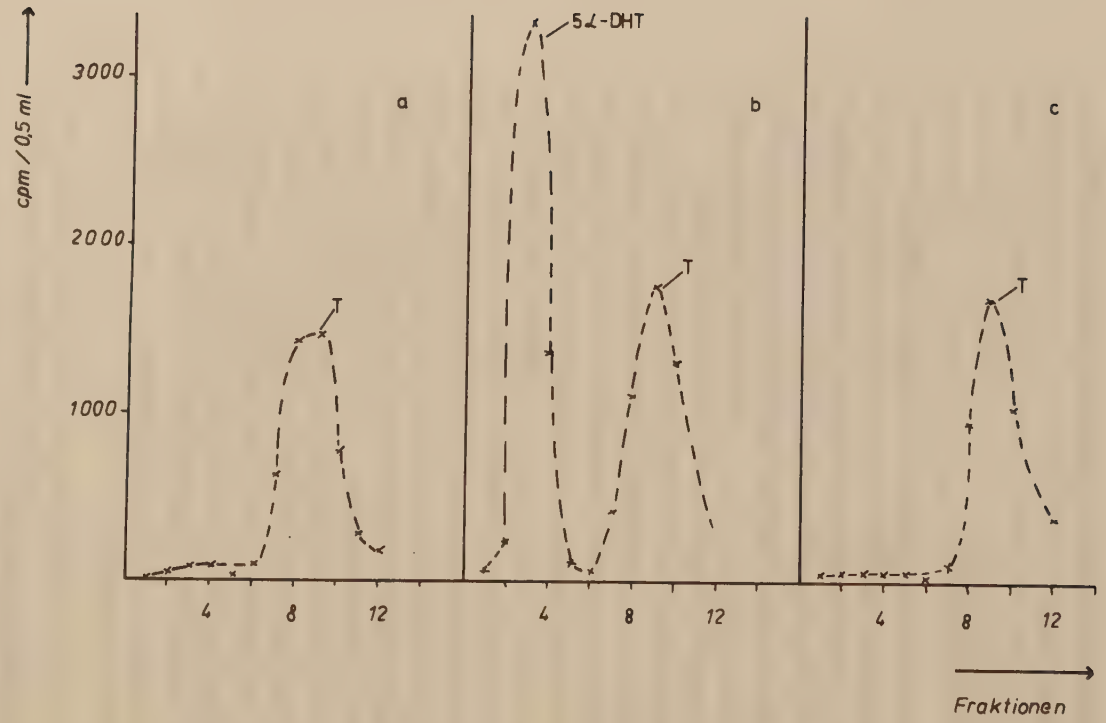

Abb. 7: Das Elutionsverhalten von Testosteron und 5-α-Dihydrotestosteron nach vorherigem Auftragen in unterschiedlichen Volumina des Extraktionsmittels und anschließender Elution
Adsorptionsmaterial Bio-Sil A, 200-400 mesh; Steroide: (1,2^{3}H)-5α-DHT; (1,2^{3}H)-T
Extraktionsmittel: a) rad. T in 25 ml Dichlormethan
b) rad 5α-DHT plus rad. T in 25 ml Dichlormethan
c) rad T in 0,1 ml Dichlormethan
Elutionsmittel: Benzol/Aethylacetat 90/10

Dichlormethan keinen wesentlichen Einfluß auf die Lage des Testosteronpeaks bei der Elution.
Bei der Aufgabe in 25 ml Dichlormethan erscheint Testosteron geringfügig früher als bei der Aufgabe in 0,1 ml Dichlormethan. Bei der Extraktion aus einer Serumprobe verändert sich das Elutionsverhalten der radioaktiven Steroide (Abb. 8). Das Elutionsverhalten entspricht der Verwendung polarerer Elutionsmittel. Das kann dadurch ausgeglichen werden, daß ein unpolareres Extraktionsmittel wie Dichlormethan/Hexan 50/50 verwendet wird.
Es scheint so, daß die Extraktion wässriger Lösungsmittel zu einer Veränderung der Polarität des Extraktionsmittels führt, wahrscheinlich durch Aufnahme von Wasser, welches durch Verwenden eines Phasentrennfilters nicht vollständig entfernt werden kann.

3. Vergleich des direkten Auftragens mit den Extraktionsmitteln Dichlormethan und Diäthyläther

Bei sehr polaren Steroiden erweist sich die Extraktion mit Diäthyläther als günstig, da sie häufig höhere Ausbeuten erbringt als vergleichbare Extraktionsmittel.
Aus diesem Grunde haben wir die Extraktion mit Dichlormethan und Diäthyläther verglichen.

a. Versuchsdurchführung

Eine Standardmenge von (1,2^{3}H)-Testosteron und (1,2^{3}H)-5-α-Dihydrotestosteron wurde in je 2 ml Plasma gelöst und mit Dichlormethan bzw. Diäthyläther extrahiert. Die Extrakte wurden über einen Phasentrennfilter auf eine 7 cm-Kieselgelsäule, die wie früher beschrieben hergestellt war, aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Benzol/Äthylacetat 90/10.

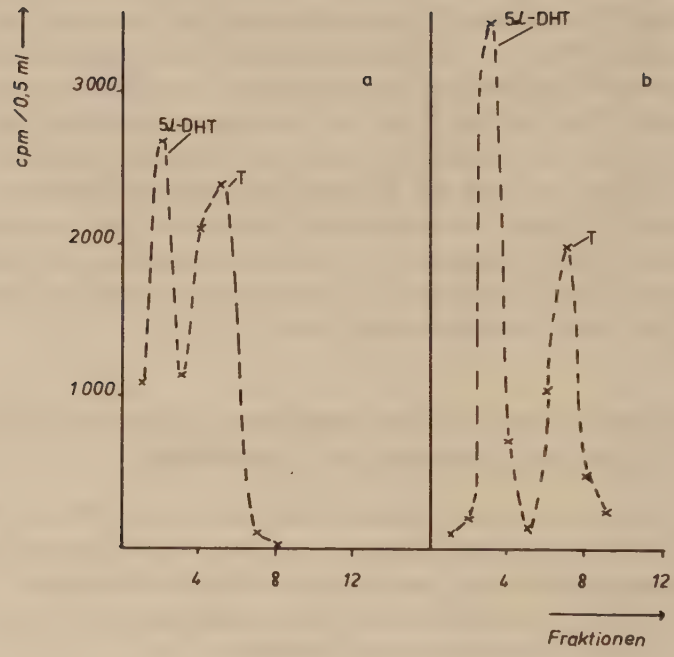

Abb. 8: Die Trennung zweier Steroide an einer Mikrosäule (4 x 70 mm) nach vorheriger Extration aus Plasma in unterschiedlichen Extraktionsmitteln

Adsorptionsmittel: Bio-Sil A 200-400 mesh
Steroide: (1,2^{3}H)-5-α DHT; (1,2^{3}H)-T
Elutionsmittel: Benzol/Äthylacetat 90/10
Fraktionsvolumen: 3 ml
Extraktionsmittel: a) Dichlormethan 25 ml
b) Dichlormethan/Hexan 50/50

b. Ergebnis und Diskussion

Wie die Abb. 9 zeigt, ist nach dem Durchlaufen des Diäthyläther nur noch eine kleine Restaktivität auf der Säule, die durch Elution mit Benzol/Äthylacetat 90/10 in der ersten Fraktion eluiert wird. Durch die Extraktion mit Dichlormethan dagegen erscheint der größte Teil der zugegebenen Radioaktivität bei der Elution mit Benzol/Äthylacetat, allerdings ist die Trennung nicht zufriedenstellend. Sie läßt sich aber durch Mischung mit unpolaren Extraktionsmitteln weiter verbessern wie für Dichlormethan/Hexan 50/50 gezeigt (Abb. 10).
Da der größere Teil der extrahierten Steroide bei Verwendung von Diäthyläther durch das Extraktionsmittel selbst eluiert wird, ist es für das direkte Auftragen auf die Säule unbrauchbar. Ist die Verwendung von Diäthyläther notwendig, so muß das Extraktionsmittel eingedampft werden und der Rückstand in einer kleinen Lösungsmittelmenge auf die Säule aufgetragen werden.

4. Der Einfluß der Elution einer Kieselgelsäule durch Lösungsmittel verschiedener Polarität auf den Blankwert

Die Verwendung von Kieselgel bereitet bei der radioimmunologischen Steroidbestimmung deshalb Schwierigkeiten, weil eine Verschleppung von Kieselgel oder von Substanzen im Kieselgel die Bestimmung stören. Wir haben deshalb untersucht, welchen Einfluß die Verwendung von Elutionsmitteln verschiedener Polarität auf die Größe des Blanks hat.

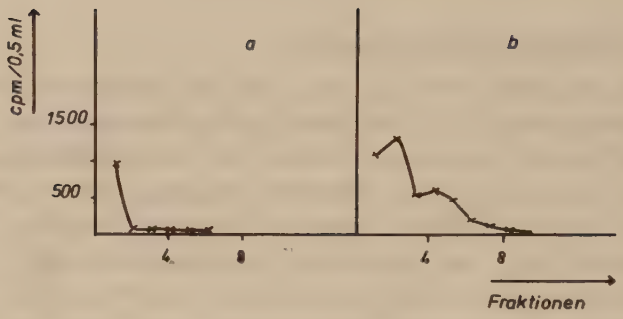

Abb. 9: Trennung zweier Steroide an einer Mikrosäule (4 x 70 mm) nach vorheriger Extraktion aus Plasma durch verschiedene Extraktionsmittel und direktem Auftragen ohne einzudampfen
Adsorptionsmaterial: Bio-Sil A, 200-400 mesh
Steroide: (1,2^{3}H)-5α-DHT; (1,2^{3}H)-T
Extraktionsmittel: a) Diäthyläther 25 ml
b) Dichlormethan 25 ml
Elutionsmittel: Benzol/Aethylacetat 90/10
Fraktionsvolumen: 3 ml

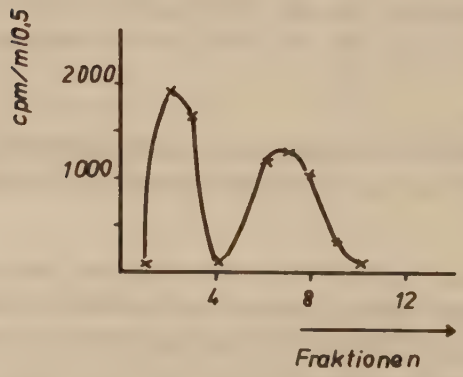

Abb. 10: Trennung zweier Steroide an einer Mikrosäule (4 x 70 mm) nach vorheriger Extraktion aus Plasma durch Dichlormethan/Hexan
Adsorptionsmittel: Bio-Sil A, 200-400 mesh
Steroide: (1,2^{3}H)-5α DHT; (1,2^{3}H)-T
Extraktionsmittel: Dichlormethan/Hexan 50/50 25 ml
Elutionsmittel: Benzol/Äthylacetat 90/10

a. Versuchsdurchführung

Es wurden wie in Abschnitt III.B.1. beschrieben Kieselgelsäulen mit Kieselgel von Bio-Rad (Bio-Sil A 200 - 400 mesh)hergestellt und zur Gleichgewichtseinstellung mit Benzol/Aethylacetat 98/2 eluiert. Daran anschließend wurde je Säule mit 10 ml Äthanol, Aceton, Äthylacetat, Dichlormethan oder Äther eluiert. Das Eluat wurde eingedampft und das Ausmaß des Rückstandes vergleichsweise abgeschätzt.
In einem zweiten Versuch wurden die Säulen mit 10 ml Äthanol, Methanol, Aceton, Äthylacetat, Dichlormethan, Äther, Dichlormethan/Methanol 90/10 eluiert. Die Eluate wurden eingedampft. Nach Zugabe von 0,5 ml Aldosteron-Antikörper (Antikörper gegen Aldosteron-21-hemisuccinat-BSA in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4, 1 mg/0,5 ml γ-Globulin vom Rind, 0,9 % NaCl, 0,01 % Naazid) und einer definierten Menge von etwa 10.000 cpm radioaktivem (1,2^{3}H)-Aldosteron wurde über Nacht bei 4° C inkubiert. Die Trennung der gebundenen und der freien Fraktion erfolgte durch Zugabe von 0,5 ml einer Charcoal-Dextran Lösung (125 mg Norit A und 25 mg Dextran in 100 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4). Die Radioaktivität von 0,5 ml des Überstandes wurde gemessen. Die mit einem Rückstand des Eluats inkubierten Proben wurden als Aldosteron-Äquivalente aus einer gleichzeitig angefertigten Aldosteron-Eichkurve berechnet.

b. Ergebnis und Diskussion

Nach dem Eindampfen der Eluate zeigte sich nach Verwendung von Äthanol ein deutlicher weißlicher Rückstand, der bei Verwendung von Methanol geringfügig kleiner war; bei Verwendung von Aceton und Dichlormethan/Methanol 90/10 war gerade noch ein Rückstand erkennbar. Bei Verwendung von Äthylacetat und Äther konnte kein Rückstand gesehen

werden. Wie die Tab. 8 zeigt, entsprechen die Aldosteron-Äquivalente dem optischen Eindruck. Mit 17.1 pg bei Methanol und 14,7 pg bei Äthanol Aldosteronäquivalent erbringt die Elution mit den hochpolaren Elutionsmitteln die höchsten störenden Blankwerte. Mit 2,8 pg bei Verwendung von Äther werden erheblich niedrigere Blankwerte erreicht. Für die praktische Arbeit kann daraus der Schluß gezogen werden, daß es zur Erzielung eines niedrigen Blanks günstig ist, unpolare Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemische zu verwenden und die Elution mit polaren Lösungsmitteln wie Äthanol und Methanol zu vermeiden.

	Methanol (pg)	Äthanol (pg)	Aceton (pg)	Äthylacetat (pg)	Dichlormethan (pg)	Äther (pg)	Dichlormethan/Methanol 9/1 (pg)
1	140	0	0	0	0	0	11
2	0	8	30	0	0	0	5
3	3	12	5	2	8	3	8
4	2	110	8	1	5	1	9
5	0	12	11	5	5	7	13
6	6	11	2	1	8	2	11
7	7	5,5	1,5	5	5	0	0
8	0	0	0	5	0	0	0
9	21	0	0	0	0	0	0
10	14	1,5	16	2,5	0	1,5	5
11	0	4	5	0	0	0	2
12	12,5	12,5	0	5	2,5	10,5	6,5
13							
	M:17,125	M:14,708	M:6,038	M:2,2083	M:2,7916	M:2,0833	M:5,875

Tab. 8: Der Einfluß der Elution einer Kieselgelsäule durch Lösungsmittel unterschiedlicher Polarität auf den Blankwert, angegeben in pg Aldosteronäquivalent

(Aliquot des Elutionsvolumens zur radioimmunologischen Aldosteronbestimmung; AK gegen Aldosteron-21-hemi-succinat; (1,2^{3}H)-Aldosteron)

C. Die erstmalige Verwendung von porösem Glas zur Chromatographie von androgenen Steroiden und seine Verwendung im Radioimmunoassay

1. Problemstellung

Die Adsorptionschromatographie mit Kieselgel und Aluminiumoxyd wird trotz ihrer guten Trennergebnisse bei der radioimmunologischen Steroidbestimmung wegen des hohen unspezifischen Blanks des Chromatographiematerials häufig kritisiert (19).
Auf der Suche nach Adsorptionsmaterial mit guten Trenneigenschaften, einfacher Handhabung, niedrigem unspezifischem Blank im Radioimmunoassay und mit wiederholter Verwendungsmöglichkeit von Mikrosäulen, wurde von uns erstmals das für die Permeationschromatographie entwikkelte Controlled-Pore-Glass auf seine Eignung für die Chromatographie androgener Steroide und seine Verwendbarkeit bei der radioimmunologischen Androgenbestimmung untersucht. Controlled-Pore-Glass besteht aus porösen Glaspartikeln mit definierter Korngröße und Porengröße (Produktbeschreibung: Serva-Information).

2. Material

Glassäule (4 x 100 mm) mit aufgeschmolzenem Vorratsbehälter; (s. Abb. S.29) Glaswolle, Merck; Glassfiberpaper GF/D, Whatman; Controlled-Pore-Glass CPG-10, Körnung 200-400 mesh, 80-120 mesh, Porengröße 81 A, 159 A, 126 A; Phase separating paper, Whatman; Radioaktive Steroide: (1,2^{3}H)-Cholesterol, (7^{3}H)-Dihydroepiandrosterone, (1,2^{3}H)-5-α-Dihydrotestosteron, (1,2^{3}H)-Testosteron, (1,2^{3}H)-5-α-Aandrostane-3-α, 17 ßdiol, (1,2^{3}H)-5-α-Androstane-3ß, 17 ß diol vom Radiochemical Centre, Amersham; (1,2^{3}H)-Etiocholanolone, (1,2^{3}H)-An-

drosterone, Men; Benzol, Fluka; Methanol, Dichlormethan, J.F. Baker; Äthylacetat, Merck; Scintigel, Roth; Natriumazid, Natriumchlorid, Merck; Gammaglobulin aus Rinderserum, Norit A, Dextran (MG: 60 000 - 90 000) Serva; Antikörper (Kaninchen) gegen Testosteron-glycinhydrazid-BSA.

3. Versuchsdurchführung

a. Herstellung einer Mikrosäule

In einer Mikrosäule (4 x 100 mm) mit aufgeschmolzenem Vorratsbehälter für Elutionsmittel (Säulenabschluß: Glaswolle und ein ausgestanzter Glasfiberfilter GF/F) wird - in einer in den Legenden angegebenen Suspension von Controlled-Pore-Glass (Spezifität in den Legenden) - mit Benzol/Methanol 85/15 gefüllt. Nach Elution mit Benzol wird die radioaktive Steroidprobe in 0,1 ml des jeweiligen Elutionsmittels auf die Säule pipettiert. Die Chromatographie erfolgt entsprechend dem Trennproblem mit Gemischen von Benzol/Äthylacetat, Hexan/Äthylacetat oder Dichlormethan/Äther. Die Radioaktivität der eluierten Steroide wurde durch Liquidszintillationsmessung eines Eluataliquots in einem Packard-Szintillationsmeßgerät bestimmt.

4. Ergebnisse und Diskussion

a. Trennung von Androgenen an einer Mikrosäule mit Controlled-Pore-Glass CPG-10

Die Abb. 11 zeigt die Trennung von Cholesterin und acht Androgenen in einer Mikrosäule mit porösem Glas bei Elution mit Benzol/Äthylacetat 95/5. Bei dem benutzten Elutionsmittel erfolgt die Trennung in Cholesterin und zwei Fraktionen mit mehreren Androgenen.

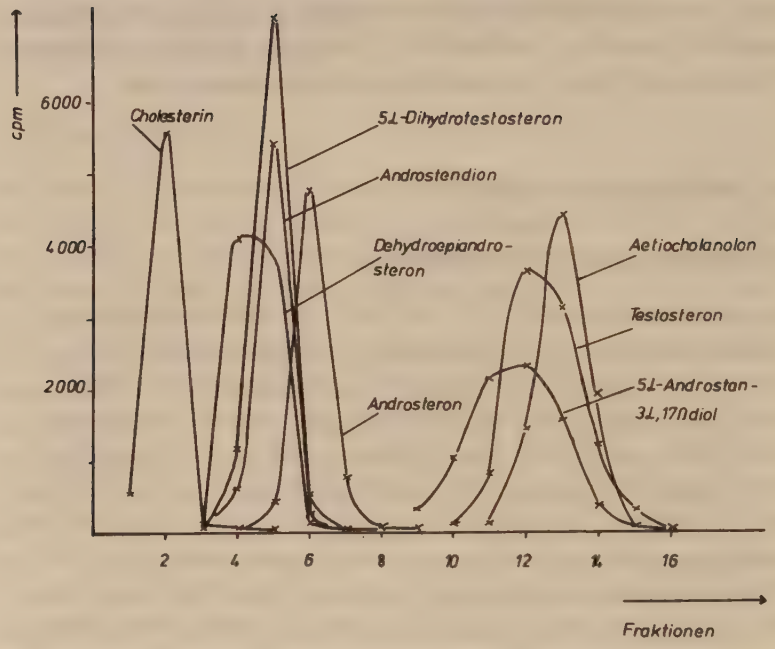

Abb. 11: Trennung von Cholesterin und acht Androgenen an einer Mikrosäule (4 x 70 mm)

Adsorptionsmittel: CPG-10; Korngröße 200-400 mesh, Porengröße 118 A
Elutionsmittel: Benzol/Äthylacetat 95/5
Fraktionsvolumen: 2 ml

b. Einfluß verschiedener Porengrößen bei gleicher Korngröße auf die Steroidbestimmung

Der Vergleich der Trennung zweier Steroide (5-α-Dihydrotestosteron und Testosteron) durch Controlled-Pore-Glass gleicher Korngröße, aber mit drei unterschiedlichen

Porengrößen (Abb. 12) zeigt, daß eine Verkleinerung der Porengröße das Trennergebnis erheblich verbessert.

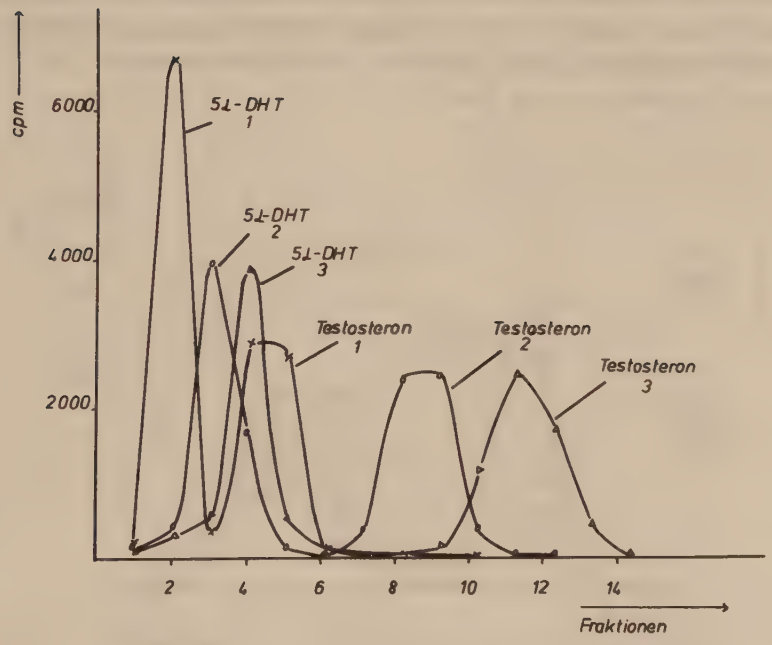

Abb. 12: Trennung zweier Steroide an einer Mikrosäule (4 x 70 mm) mit Controlled-Pore-Glass verschiedener Porengröße

Steroide: (1,2^{3}H)-5-α-DHT; (1,2^{3}H)-T
1) CPG 10; Korngröße 200-400 mesh; Porengröße 240 A
2) CPG 10; Korngröße 200-400 mesh; Porengröße 118 A
3) CPG 10; Korngröße 200-400 mesh; Porengröße 81 A
Elutionsmittel: Benzol/Äthylacetat 95/5
Fraktionsvolumen: 3 ml

c. Einfluß verschiedener Korngrößen bei gleicher Porengröße auf die Steroidtrennung

Wie Abb. 13 zeigt, hat die Korngröße keinen wesentlichen Einfluß auf die Lage der Steroidpeaks. Der Steroidpeak ist aber bei größeren Korngrößen breiter. Da die Laufgeschwindigkeit des Elutionsmittels bei Verwendung größerer Korngrößen beträchtlich zunimmt, muß im Einzelfall entschieden werden, ob eine Verbreiterung des Steroidpeaks zugunsten einer größeren Laufgeschwindigkeit in Kauf genommen werden kann.

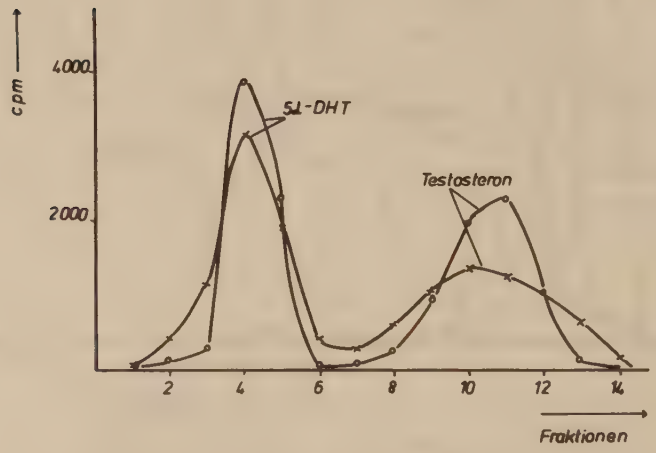

Abb. 13: Trennung zweier Steroide an einer Mikrosäule (4 x 70 mm) mit Controlled-Pore-Glass verschiedener Korngröße

Steroide: (1,2³H)-5-α-DHT; (1,2³H)-T
x - x 1) CPG-10, Korngröße 200-400 mesh; Porengröße 118 A
o - o 2) CPG-10; Korngröße 80-120 mesh; Porengröße 126 A
Elutionsmittel: Benzol/Äthylacetat 95/5
Fraktionsvolumen: 3 ml

d. Einfluß der Polarität des Elutionsmittels und der Säulenlänge auf die Trennung der Steroide an einer Mikrosäule mit porösem Glas

Die Abb. 14 zeigt, daß bei gleicher Säulenlänge und gleichem Adsorptionsmittel eine geringe Verminderung der Polarität des Elutionsmittels, die Trennung der beiden untersuchten Steroide-5-α-Dihydrotestosteron und Testosteron - wesentlich verbessert.

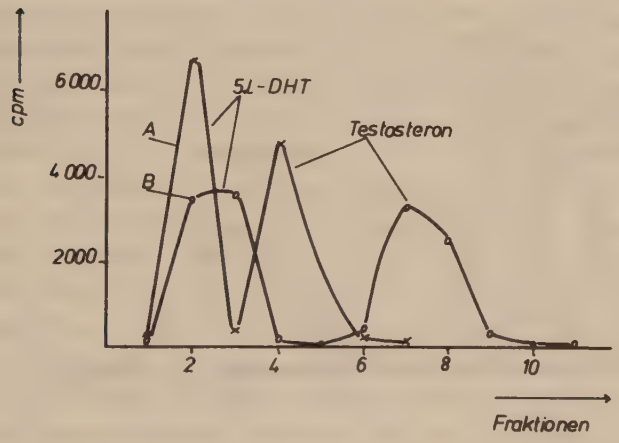

Abb. 14: Trennung zweier Steroide an einer Mikrosäule (4 x 70 mm) durch Elutionsmittel unterschiedlicher Polarität

Adsorptionsmittel: CPG 10; Korngröße 200-400 mesh; Porengröße 118 A
Steroide: (1,2^{3}H)-5-α-DHT; (1,2^{3}H)-T
Elutionsmittel: A: Benzol/Äthylacetat 92/8
B: Benzol/Äthylacetat 95/5

Die Abb. 15 zeigt, daß die Verlängerung der Säulenhöhe gefüllt mit CPG-10, von 5 auf 10 cm eine starke Verbesserung der Trennung von 5-α-Dihydrotestosteron und Testosteron ergibt.

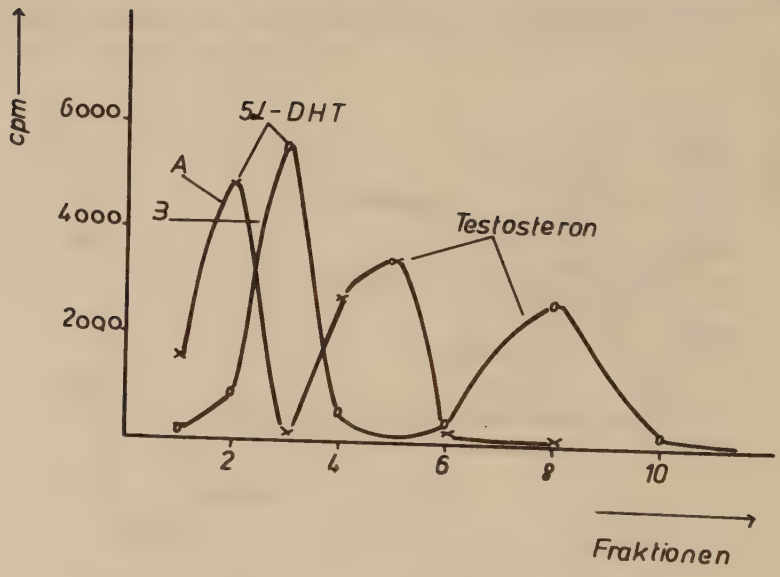

Abb. 15: Trennung zweier Steroide an Mikrosäulen unterschiedlicher Höhe (4 x 50 mm und 4 x 100 mm) mit Controlled-Pores-Glass

Adsorptionsmittel: CPG-10; Korngröße 200-400 mesh; Porengröße 118 A
Steroide: (1,2^{3}H)-5-α-DHT; (1,2^{3}H)-T
Säulenlänge A: 50 mm
B: 100 mm
Fraktionsvolumen: 3 ml

e. Die Untersuchung weiterer Elutionsmittelgemische zur Säulenchromatographie mit CPG-10

Aufgrund unserer guten Erfahrung mit der Verwendung eines Elutionsmittelgemisches Hexan/Äthylacetat zur chromatographischen Trennung von androgenen Steroiden an Kieselgel-Mikrosäulen, wo sich durch dieses Elutionsmittel schärfere Trennungen der Steroide als bei Verwendung von Benzol/Äthylacetat erzielen lassen, haben wir einige Trennversuche mit diesem Elutionsmittelgemisch durchgeführt.
Es wurde eine, wie früher beschriebene,Mikrosäule hergestellt. Radioaktives 5-α-Dihydrotestosteron und Testosteron wurde in 0,1 ml Hexan/Äthylacetat auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Hexan/Äthylacetat 90/10.
Wie die Abb. 16 zeigt, wird eine einwandfreie Trennung der beiden Radioaktivitätspeaks erreicht. Auffällig bei der Trennung ist, daß die Radioaktivität in einer im Vergleich zur Benzol/Äthylacetat-Elution relativ kleinen Elutionsmenge erscheint (5-α-DHT: 3 ml; Testosteron: 6 ml); d.h., daß mit diesem Elutionsmittelgemisch eine einwandfreie Trennung mit relativ schmalbasigen Peaks erzielbar ist. Ein geringer Nachteil dieses Elutionsmittelgemisches ist es, daß aufgrund der höheren Viskosität des Gemisches die Elution längere Zeit beansprucht als bei Verwendung von Benzol/Äthylacetat.

f. Der Einfluß des direkten Auftragens des Extraktionsmittels mit den aus Plasma extrahierten Steroiden (ohne vorherige Reduktion des organischen Extraktionsvolumens durch Eindampfen) auf eine Mikrosäule mit CPG-10, auf die Trennung der Steroide

Ziel des Versuches war es, zu prüfen, ob es notwendig ist, nach Extraktion einer Serumprobe mit 25 ml Dichlormethan,

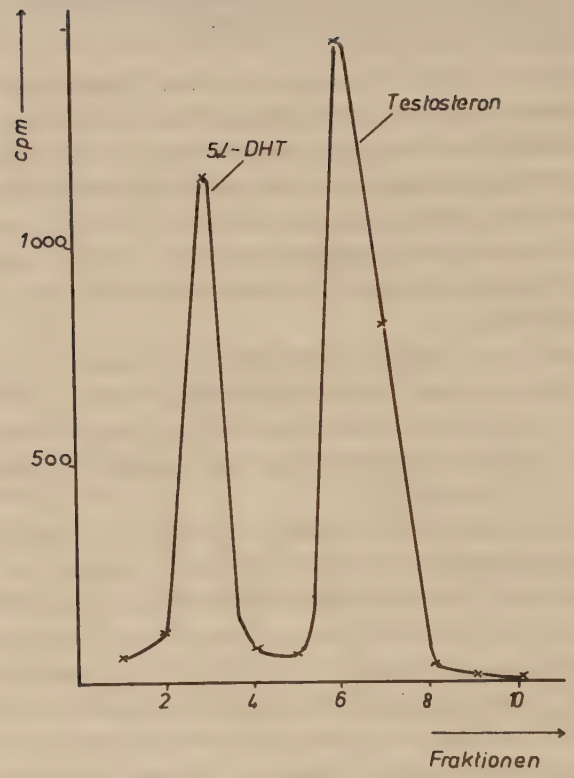

Abb. 16: Trennung zweier Steroide an einer Mikrosäule (4 x 70 mm) mit Controlled-Pore-Glass durch Elution mit Hexan/Äthylacetat

Adsorptionsmittel: CPG-10; Korngröße 200-400 mesh; Porengröße 118 A
Steroide: (1,2³H)-5α-DHT; (1,2³H)-T
Elutionsmittel: Hexan/Aethylacetat 90/10
Fraktionsvolumen: 3 ml

das Extraktionsmittel zuerst unter N_2 einzudampfen, wie es allgemein üblich ist, oder ob es möglich ist, die 25 ml Extraktionsmittel direkt auf die Säule zu geben, durchlaufen zu lassen und dann die Chromatographie mit dem geeigneten Elutionsmittel anzuschließen.

Es wurden zwei wie früher beschriebene Mikrosäulen hergestellt. Auf die Säule b wurden 0,1 ml Benzol/Äthylacetat 95/5 und je 40 000 cpm (1,2^{3}H)-Testosteron und (1,2^{3}H)-5-α-Dihydrotestosteron aufgetragen. Danach wurde mit dem Elutionsmittel Benzol/Äthylacetat 95/5 chromatographiert. Auf die Säule a wurden 25 ml Dichlormethan, das je 40 000 cpm (1,2^{3}H)-Testosteron und (1,2^{3}H)-5-α-Dihydrotestosteron enthielt, aufgetragen und durch die Säule laufen gelassen. Das Eluat wurde verworfen. Nachdem das Dichlormethan durchgelaufen war, wurde mit dem Elutionsmittel Benzol/Äthylacetat 95/5 chromatographiert. Von beiden Säulen wurde das Elutionsmittel in 3 ml Fraktionen aufgefangen.
Wie Abb. 17 zeigt, erfolgt die Elution von Testosteron und 5-α-Dihydrotestosteron früher wenn die Steroide gelöst in 25 ml Extraktionsmittel Dichlormethan aufgetragen werden, als wenn sie in 0,1 ml Elutionsmittel aufgetragen werden. Die Trennung der beiden radioaktiven Steroide wird nicht erkennbar beeinflußt. Die Abbildung zeigt, daß es nicht notwendig ist, das organische Extraktionsvolumen mit dem aus Plasma extrahierten Steroiden einzuengen und in einer kleinen Menge (0,1 ml) Elutionsmittel auf die Säule aufzutragen, sondern daß es gut möglich ist, die Steroide gelöst in einem Volumen organischen Lösungsmittels, wie es für die Extraktion von Serum üblich ist, auf die Säule zu geben. Nach dem Durchlaufen des Extraktionsmittels kann durch das Elutionsmittel noch eine sehr gute Trennung erreicht werden. Zur Eliminierung feinster Spuren von Wasser nach Extraktion einer wässrigen Probe, wurde in den späteren Versuchen das Extraktionsmittel über einen wasseradsorbierenden Phasentrennfilter auf die Säule gebracht.

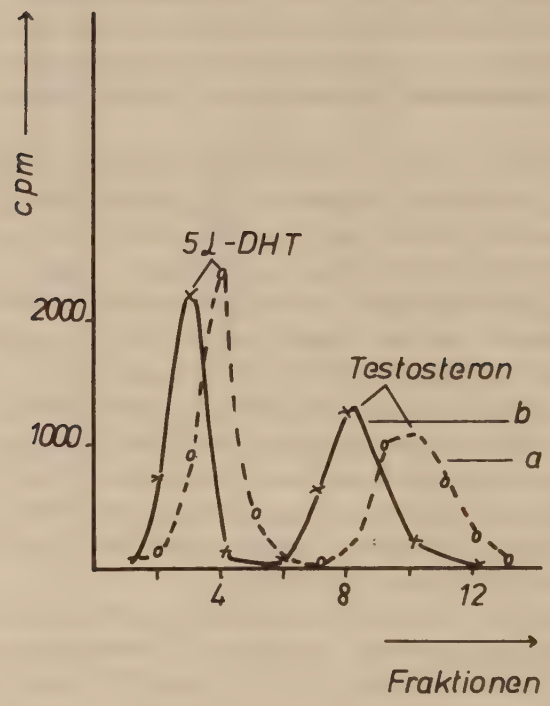

Abb. 17: Trennung zweier Steroide an einer Mikrosäule (4 x 70 mm) nach Auftragen der Steroide in unterschiedlichen Volumina des Extraktionsmittels

Adsorptionsmittel: CPG-10; Korngröße 200-400 mesh; Porengröße 118 A
Steroide: (1,2^{3}H)-5α DHT; (1,2^{3}H)-T
Extraktionsmittel: a Dichlormethan 25 ml
b Dichlormethan 0,1 ml
Elutionsmittel: Benzol/Aethylacetat 95/5
Fraktionsvolumen: 3 ml

g. Verwendung verschiedener organischer Extraktionsmittel bei direkter Aufgabe auf eine Mikrosäule aus porösem Glas

Wegen verschiedener Verteilungsquotienten der Steroide zwischen organischem Lösungsmittel und Wasser kann es notwendig sein, bei der Extraktion von Steroiden unterschiedliche organische Extraktionsmittel zu verwenden. Es mußte nun überprüft werden, ob die Verwendung der verschiedensten organischen Extrakte bei der direkten Aufgabe auf eine Mikrosäule möglich ist, die wir bei der Extraktion von Androgenen aus Plasmaproben verwenden, bzw. wie die verschiedenen organischen Extraktionsmittel die Trennung der Steroide bei sonst gleichen Chromatographiebedingungen beeinflussen. Es wurden nach der beschriebenen Art drei Mikrosäulen hergestellt und zuerst mit Methanol, dann mit 10 ml Benzol eluiert. In je drei Spitzkolben wurde etwa je 50 000 cpm radioaktives 5-α-Dihydrotestosteron und Testosteron gegeben und mit N_2 eingedampft. Danach wurden 1,5 ml Serum zugegeben und 15 Minuten zur Gleichgewichtseinstellung des endogenen und radioaktiven Steroids bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Es wurden 25 ml Diäthyläther, Dichlormethan oder Dichlormethan/Hexan 50/50 zu je drei Spitzkolben zugegeben und 15 Minuten auf einem Schüttler geschüttelt. Anschließend wurden die Spitzkolben 10 Minuten bei 3000 U/Min. in einer Laborzentrifuge abzentrifugiert. Die organische Phase wurde über einen Phasentrennfilter direkt auf die Säule pipettiert. Nach dem Eindampfen des organischen Extraktionsmittels wurde mit Benzol/Äthylacetat 95/5 chromatographiert und die Fraktion in je 3 ml Portionen aufgefangen. Von jeder Fraktion wurde ein 0,5 ml Aliquot in einem Scintillationsmeßgerät gemessen.

Die Abb. 18 zeigt, daß durch die drei verschiedenen Extraktionsmittel sowohl die Menge der wiedergefundenen Radioakti-

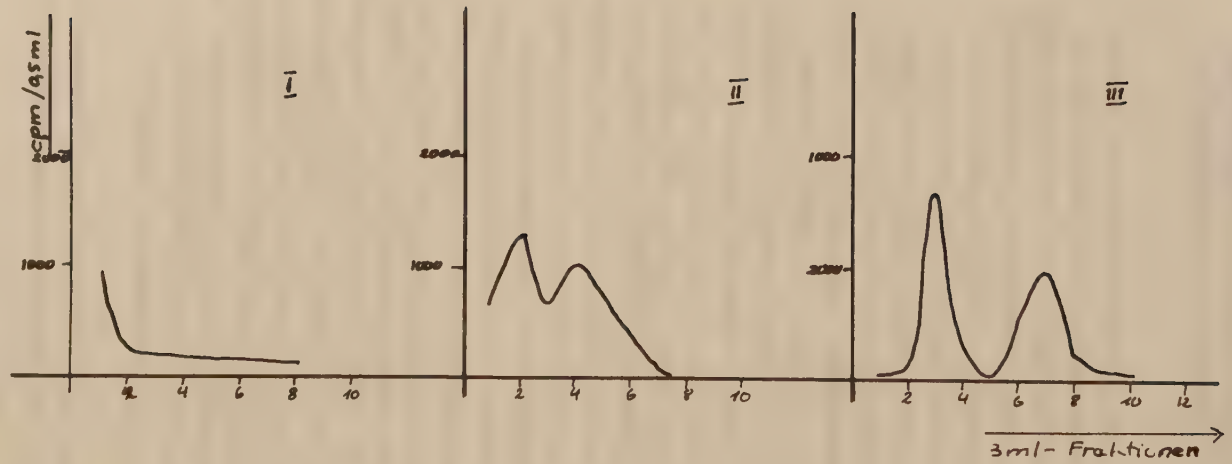

Abb. 18: Trennung zweier Steroide an einer Mikrosäule (4 x 70 mm) nach vorheriger Extraktion aus Plasma unter Verwendung verschiedener Extraktionsmittel

Adsorptionsmittel: CPG-10; Korngröße 200-400 mesh; Porengröße 118 A
Steroide: (1,2^{3}H)-5-α DHT; (1,2^{3}H)-T
Extraktionsmittel: I Diäthyläther
II Dichlormethan
III Dichlormethan/Hexan 50/50
Elutionsmittel: Benzol/Aethylacetat 95/5
Fraktionsvolumen: 3 ml

vität, als auch die Trennung der Steroide in hohem Maße beeinflußt wird. Dabei ist zu sehen, daß die Menge der wiedergefundenen Radioaktivität um so höher, die Trennung der Steroide um so besser ist, je unpolarer das Extraktionsmittel bzw. das Extraktionsmittelgemisch ist. Wird zur Extraktion Diäthyläther benutzt, so ist bei der Elution in der ersten Probe gerade noch eine geringe Radioaktivität meßbar. Wird zur Extraktion Dichlormethan benutzt, ist die Ausbeute erheblich besser bei angedeuteter Trennung der beiden eingesetzten Steroide. Von den benutzten Extraktionsmitteln zeigt nur die Extraktion mit Dichlormethan/Hexan 50/50 sowohl eine voll befriedigende Wiederfindung der Radioaktivität nach der Elution, als auch eine gute Trennung der beiden eingesetzten Steroide.
Wie der Vergleich der Chromatographie von Testosteron und 5-α-Dihydrotestosteron zeigt, welche in Dichlormethan mit (Abb. 19a) oder ohne (Abb. 19b) vorherige Extraktion aus dem Plasma auf die Säule aufgebracht wurde, ist die Wiederfindung und Trennung der beiden Steroide durch die zusätzliche Plasmaextraktion verschlechtert. Die Erklärung dürfte sein: Die Adsorptionsfähigkeit des porösen Glases ist nicht sehr ausgeprägt, so daß durch polare Lösungsmittel eine schnellere Elution erreicht wird. Durch die Extraktion einer wässrigen Serumprobe verändert sich offensichtlich die Polarität des Extraktionsmittels wie das Beispiel zeigt, zum Polaren hin, was auch nicht völlig durch einen Phasentrennfilter, der Wasserreste adsorbiert, verhindert wird. Um gute Trennergebnisse zu erreichen ist es also notwendig, relativ unpolare Lösungsmittel zu verwenden.

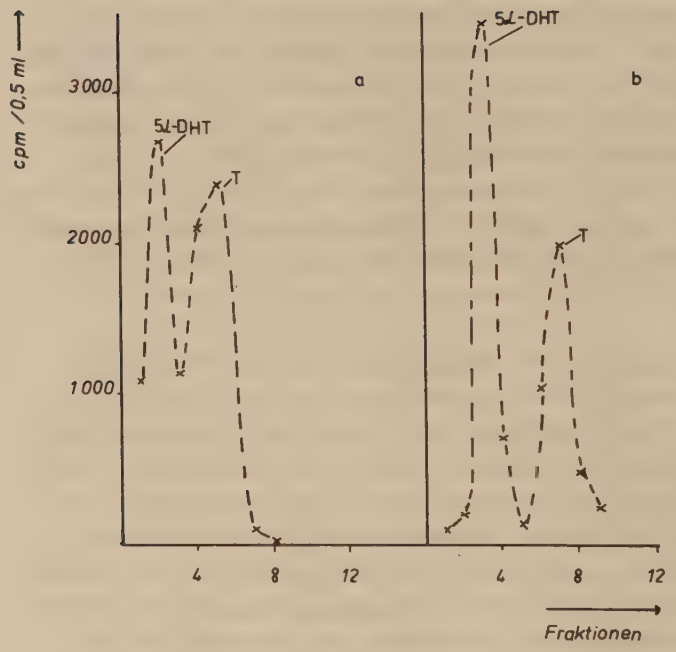

Abb. 19: Trennung zweier Steroide an einer Mikrosäule (4 x 70 mm) a) nach vorheriger Extraktion und b) ohne vorherige Extraktion aus Plasma.

Adsorptionsmittel: CPG-10, Korngröße 200-400 mesh, Porengröße 118 A
Steroide: (1,2^{3}H)-5α-DHT; (1,2^{3}H)-T
Extraktionsmittel: a Dichlormethan 25 ml
b ohne Extraktionsmittel
Elutionsmittel: Benzol/Äthylacetat 95/5
Fraktionsvolumen: 3 ml

h. Mehrmaliges Benutzen einer Mikrosäule aus porösem Glas (CPG-10)

Bei Verwendung einiger chromatographischer Materialien wie z.B. von LH 20 ist es möglich, die gleiche Säule mehrmals für die chromatographische Trennung zu benutzen. Dadurch ist durch den Wegfall des Herstellens einer neuen Säule bei jeder chromatographischen Trennung eine erhebliche Zeitersparnis zu erzielen. Es wurde nun untersucht, ob sich auch mit CPG-10 gefüllte Säulen mehrmals wiederverwenden lassen. Es wurde eine Mikrosäule, 7 cm hoch, mit CPG-10, 200-400 mesh, 81 A gefüllt. In 0,1 ml Benzol/Äthylacetat 95/5 wurde eine radioaktive Standardmenge von (1,2^{3}H)-Testosteron und (1,2^{3}H)-5-α-Dihydrotestosteron auf die Säule gegeben. Die Elution erfolgte mit einem Elutionsmittel Benzol/Äthylacetat 95/5. Es wurden 3 ml-Fraktionen aufgefangen und die Radioaktivität eines 0,5 ml Aliquots in einem Packard-Scintillationszähler gemessen. Nach dem Benutzen der Säule wurde durch Elution mit 10 ml Methanol die Säule von polaren Verunreinigungen gereinigt. Darauf erfolgte eine Äquilibrierung der Säule durch Elution mit 10 ml Benzol. Anschließend wurde in 0,5 ml Benzol/Äthylacetat erneut eine Standardmenge radioaktives Testosteron und 5-α-Dihydrotestosteron aufgefangen. Dieser Vorgang wurde insgesamt 5 mal wiederholt. Die in den einzelnen Fraktionen gefundene Radioaktivität wurde als prozentualer Anteil der in den Fraktionen 1 bis 10 insgesamt wiedergefundenen Radioaktivität berechnet. Wie die Tab. 9 zeigt, ist bei der ersten chromatographischen Trennung der Hauptanteil der Radioaktivität von 5-α-DHT in den Fraktionen 2 und 3, von Testosteron in den Fraktionen 8 und 9. Mit jedem chromatographischen Lauf verschieben sich die prozentualen Radioaktivitätsmengen von 5-α-DHT und Testosteron in frühere Fraktionen. Beim 5. Lauf ist auch keine Tren-

Chromat. Fraktion	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Anzahl der Chromatographien											
1	1,5	38	15	0,8	1,1	2,5	6,5	12,4	13,8	6,2	1,2
2	1,5	44,4	4,1	0,7	2,5	10,8	22,0	11,1	0,8	0,7	0,5
3	4,5	41,9	2,8	0,6	2,9	14,5	24,4	6,0	0,5	0,85	0,5
4	28	22	5,4	15	21	4,4	0,8				
5	31	21	18	10	13	3	0,7				

Tab.9: Untersuchung über die mehrmalige Wiederfindung einer CPG-10-Säule (4 x 70 mm)

(Adsorptionsmittel: CPG 10; 200-400 mesh; 81 A; Steroide (1,2³H)-5α-DHT; (1,2³H)-T; Elutionsmittel 95/5; Fraktionsvolumen: 3 ml; Anzahl der wiederholten Chromatographien pro Säule nach zwischenzeitlicher Reinigung mit Methanol und Aquilibrierung mit Benzol:5; Angaben erfolgten als prozentualer Anteil der wiedergefundenen Gesamtradioaktivität in den einzelnen Fraktionen)

nung von Testosteron und 5-α-DHT mehr zu erkennen. Die Verschiebung des Peaks zeigt, daß das Adsorptionsvermögen des CPG-10 nach jedem Lauf abgenommen hat und daß es allenfalls vertretbar ist, ohne Kontrolle der Peaklage die gleiche Säule nur ein weiteres Mal zu benutzen.

i. Trennung von 3-α und 3ß Androstan-17ß-diol an einer Mikrosäule mit porösem Glas (CPG-10)

Da ein von uns entwickeltes Antiserum zur Bestimmung von 3ß-Androstandiol eine erhebliche Kreuzreaktion mit 3α-Androstandiol hatte, mußte ein geeignetes chromatographisches Trennsystem dieser beiden Steroide entwickelt werden. Die Trennung der beiden Androstandiole an Kieselgel ist sehr schwierig. Bisher ist in der Literatur kein brauchbares Dünnschichtsystem zur Trennung dieser beiden Androgene angegeben. Die bekannte Trennung der beiden Steroide auf Aluminiumoxyd G-Dünnschichtplatten ist nicht optimal, da 3-α-Androstandiol durch das System Benzol/Äthylacetat 95/5 mit Schwanzbildung chromatographiert wird. Als weiteres Dünnschichtsystem ist von uns eine Trennung auf Aluminiumoxyd T entwickelt worden (Abb. 5). Da die Trennung der Androstandiole aber ein dreimaliges Laufen erfordert, und dazu die Dünnschichtchromatographie für routinemäßige radioimmunologische Steroidbestimmung ein zu aufwendiges Verfahren ist, haben wir überprüft, ob durch Chromatographie mit CPG-10 eine Trennung zu erzielen ist.
Die Mikrosäulen wurden wie früher beschrieben hergestellt. Wie die Abb. 20 zeigt, ist durch Elution mit Dichlormethan/Äther 98/2 insbesondere mit der 10 cm langen Säule eine Trennung der beiden Steroide erfolgt, die Trennung ist aber noch mit einer gewissen Überlappung des Peaks verbunden.

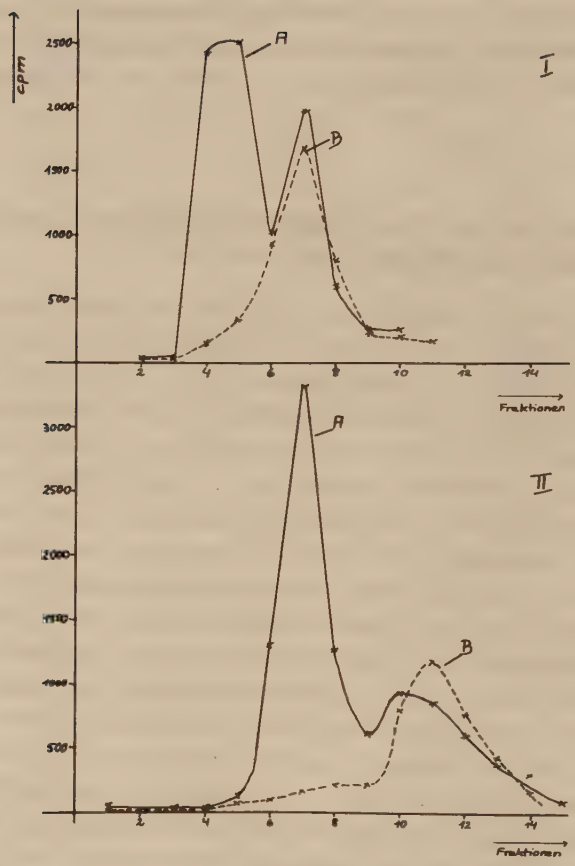

Abb. 20: Trennung von 3α-Androstan-17ß-diol und 3ß-Androstan-17ß-diol an einer Mikrosäule

Adsorptionsmaterial: CPG-10, Korngröße 200-400 mesh Porengröße 81 A
Steroide = (1,2^{3}H)-3α-Androstandiol
(1,2^{3}H)-3ß-Androstandiol
Elutionsmittel: Dichlormethan/Aether 98/2
Fraktionsvolumen: 3 ml
A: Gemeinsames Auftragen von 3α- und 3ß-Androstandiol
B: Alleiniges Auftragen von 3α-Androstandiol
I: Säulendimension: 4 x 70 mm
II: Säulendimension: 4 x 100 mm

Die Abb. 21 zeigt die Trennung der beiden Androstandiole an einer 10 cm hohen mit CPG-10 gefüllten Mikrosäule nach Elution mit Dichlormethan/Äther 99/1. Die Abbildung zeigt die beiden Androstandiole einwandfrei getrennt.
Die Ergebnisse zeigen, daß mit den Mikrosäulen bei Verwendung von porösem Glas so schwierige Trennprobleme (beim Vergleich mit Kieselgel und Aluminiumoxyd als Adsorptionsmittel) wie die Trennung von 3-α - und 3ß-Androstandiol ohne Schwierigkeiten durchzuführen sind.

k. Der unspezifische Blank von Controlled-Pore-Glass bei der radioimmunologischen Steroidbestimmung

Bei der radioimmunologischen Steroidbestimmung ist von erheblicher Bedeutung, wie groß der unspezifische Blank durch die Verunreinigung des Chromatographiematerials ist.
Unter unspezifischem Blank versteht man beim praktischen radioimmunologischen Arbeiten den Anteil an der ermittelten Menge des Steroids, der nicht durch die wahre in der Probe enthaltenen Steroidmenge, sondern durch den Einfluß von Verunreinigung an Geräten, Lösungsmitteln und Chromatographiematerial hervorgerufen wurde (11).

Zur Messung des unspezifischen Blanks des Chromatographiematerials wurden auf acht Säulen, gefüllt mit CPG-10, Porengröße 118 A, Korngröße 200-400 mesh, 50 ml Elutionsmittel Benzol/Äthylacetat 95/5 gefüllt und hintereinander vier Fraktionen von je 12 ml aufgefangen. Anschließend wurden die Proben sowie sieben Fraktionen Elutionsmittel, die nicht zur Chromatographie verwendet worden waren, im Exsikkator durch Unterdruck eingedampft. Zum Rückstand wurden 0,5 ml Testosteronantikörperlösung (Antikörper gegen Testosteron-3-glycinhydrazid-BSA in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4, 0,01 % Natriumazid, 0,1 % Gammaglobulin

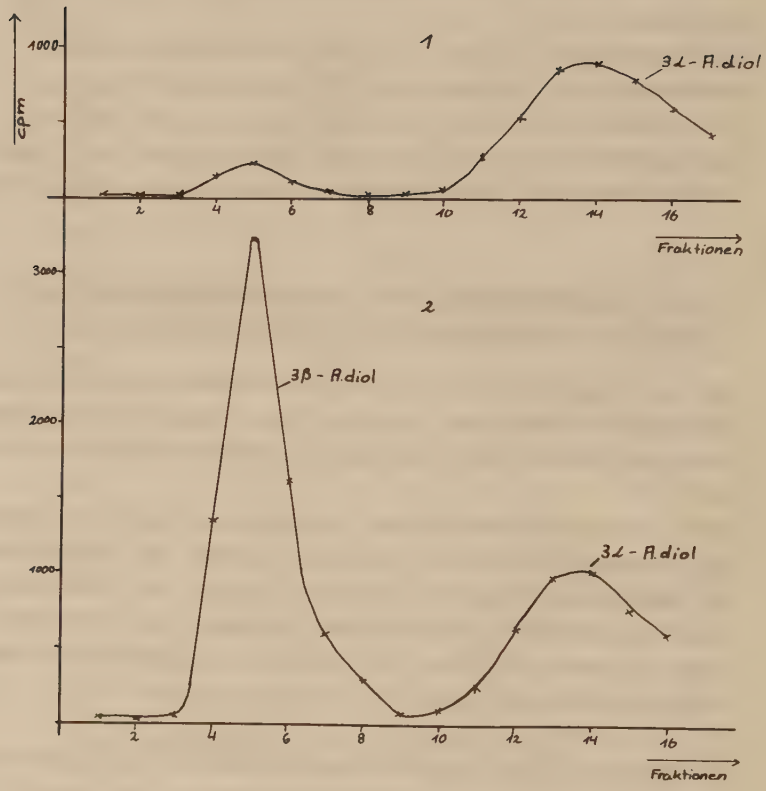

Abb. 21: Trennung von 3-α-Androstan-17ß-diol und 3ß-Androstan-17ß-diol an einer Mikrosäule (4 x 100 mm)

Adsorptionsmittel: CPG-10; Korngröße 200-400 mesh; Porengröße 81 A
Steroide: (1,2³H)-3-α-Androstandiol, (1,2³H)-3ß-Androstandiol
Elutionsmittel: Dichlormethan/Aether 99/1
Fraktionsvolumen: 3ml

1) 3α-Androstandiol
2) 3ß-Androstandiol plus 3α-Androstandiol

vom Rind, 0,9 % Natriumchlorid, (Titer 1:25 000) pipettiert und über Nacht bei 4° C inkubiert. Die Trennung der gebundenen und freien Fraktionen erfolgte durch Zugabe einer Charcoal-Dextranlösung (0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4, 0,125 % Norit A, 0,025 % Dextran). Nach 15 Minuten wurde in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert und 0,5 ml des Überstandes mit 7 ml Szintigel in einem Plastikgefäß im Packard gemessen.

Wie die Tab. 10 zeigt, liegt der Blank der einzelnen 12 ml-Fraktionen, gemessen als Testosteronäquivalent des eingedampften Elutionsmittelrückstandes im RIA nach der Chromatographie nicht signifikant über dem gleich großer Fraktionen ohne Chromatographie. Aus diesem Grund ist die Verwendung von porösem Glas wegen des niedrigen unspezifischen Blanks gerade für den RIA mit Chromatographie von Interesse.

Fraktion I (0-12 ml) : $x_1 = 5{,}4 \pm 3{,}2$ pg Testosteron
Fraktion II (12-24 ml) : $x_2 = 5{,}9 \pm 4{,}1$ pg Testosteron
Fraktion III (24-36 ml) : $x_3 = 7{,}1 \pm 2{,}4$ pg Testosteron
Fraktion IV (36-48 ml) : $x_4 = 7{,}5 \pm 5{,}3$ pg Testosteron
Elutionsmittelkontrolle : $x_L = 5{,}5 \pm 2{,}9$ pg Testosteron

Tab. 10:
Anzahl der Säulen n = 8; Adsorptionsmittel: CPG-10, Porengröße 81 A;
Elutionsmittel: Benzol/Äthylacetat 95/5
Elutionsmittelkontrolle: n = 7

Unspezifischer Blank einer Mikrosäule (4 x 70 mm) gefüllt mit Controlled-Pore-Glass gemessen als Testosteronäquivalent

IV. Untersuchungen zu Trennmethoden der gebundenen und freien Testosteronfraktion

1. Die Fällung von antikörpergebundenem Testosteron durch Polyethylenglycollösungen (37) verschiedener Konzentrationen

Ziel des Versuches war es herauszufinden, mit welcher Konzentration einer Polyethylenglycollösung eine optimale Trennung der antikörpergebundenen und freien Testosteronfraktion möglich ist.

a. Versuchsdurchführung

In 16 Glaszentrifugenröhrchen wurden 0,5 ml Antikörperlösung einer Testosteronantikörperlösung und 13 000 cpm (1,2^{3}H)-Testosteron 18 Stunden im Kühlschrank bei 4° C inkubiert. (Testosteron-7-thioäther-Antiserum der Antikörperlösung, Titer 1:100 000, verdünnt in 0,15 M Phosphatpuffer pH 7,4, 0,9 % NaCl; 0,01 % Natriumazid; 0,1 %-γ-Globulin vom Rind).
Nach 18 Stunden Inkubation wurden 0,5 ml einer Polyethylenglycollösung in 0,15 M Phosphatpuffer verschiedener Konzentrationen (20 %, 30 %, 40 %, 50 %) in je vier der Inkubationsröhrchen zupipettiert. Die Mischung wurde 5 sec geschüttelt und anschließend stehen gelassen. Nach 15 Min. wurde in einer Kühlzentrifuge (2500 U/Min., 15 Min.) abzentrifugiert. 0,5 ml des Überstandes wurden in ein Szintillationsmeßgefäß pipettiert und nach Zugabe von 7 ml Szintigel im Packard gemessen. Es wurde das arithmetische Mittel der antikörpergebundenen Testosteronfraktion aller Proben, die mit gleicher Polyethylenglycollkonzentration behandelt worden waren, gebildet.

b. Ergebnis und Diskussion

Die Abb. 22 zeigt, daß bei Zusatz einer 20 %-igen Polyethylenglycollösung (Endkonzentration im Inkubationsröhrchen : 10 %) offensichtlich nicht alles antikörpergebundene Testosteron ausgefällt ist und daß mit einer 30 %-igen Polyethylenglycollösung (mit einer Endkonzentration von 15 % Polyethylenglycoll) die maximale Menge von antikörpergebundenem radioaktivem Testosteron ausfällbar wird. Eine Steigerung der Polyethylenglycollösung erbringt keine weitere Steigerung an Ausfällung antikörpergebundenen Testosterons. Da die Pipettierbarkeit auf Grund der hohen Vikosität der Lösung mit höherer Konzentration schlechter wird, ist es notwendig, eine 30 %-ige Lösung zu verwenden.

2. Die Fällung von antikörpergebundenem Testosteron durch eine 30 %-ige Polyethylenglycollösung in Abhängigkeit vom Proteingehalt der Inkubationslösung

Ziel des Versuches war es herauszufinden, bei welcher Gesamtproteinkonzentration einer Antikörperlösung eine optimale Trennung der antikörpergebundenen und freien Testosteronfraktion durch Fällung mit einer 30 %-igen Polyethylenglycollösung erreicht wird.

a. Versuchsdurchführung

Es wurde ein Testosteronantikörper (Ak gegen Testosteron-7-thioäther-BSA in einer Arbeitsverdünnung 1 : 100 000) in 0,3 ml einer 0,15 M Phosphatpufferlsg. pH 7,4 (0,9 % NaCl, 0,1 % Natriumazid) gelöst und mit 6 000 cpm ($1,2^3$H)-Testosteron 18 Stunden bei 4° C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von je 0,2 ml γ-Globulinlösung vom Rind mit verschiedenen Proteinkonzentrationen, so daß pro Inkubationsansatz 0 - 0,5 - 1 - 1,5 - 2 mg γ-Globulin

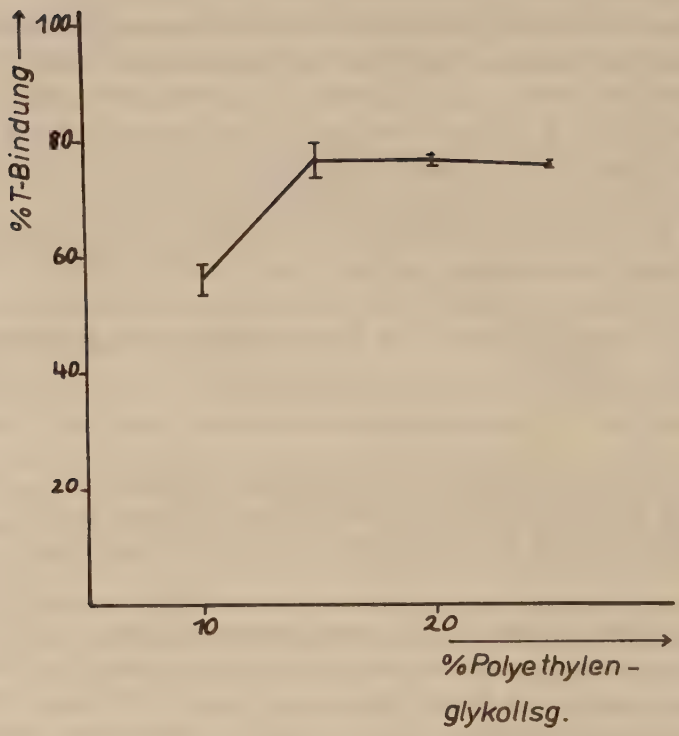

Abb. 22: Fällung von antikörpergebundenem Testosteron durch Polyethylenglycollösungen verschiedener Konzentrationen.

AK gegen T-7-thioäther-BSA-Arbeitstiter 1:100 000;
Standardmenge von (1,2^{3}H)-T; Zusatz von 1 mg γ -Globulin pro Inkubationsansatz

vorhanden waren. Von jeder einzelnen Proteinkonzentration wurden je 4 Inkubationsansätze hergestellt. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 0,5 ml 30 %-iger Polyethylenglycollösung in 0,15 M Phosphatpuffer pH 7,4 (Endkonzentration 15 %). Die Mischung wurde 5 sec geschüttelt und 15 min. bei 4° C stehen gelassen. Danach wurde 15 min. in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert. 0,5 ml des Überstandes wurde abpipettiert und nach Zugabe von 7 ml Szintillator im Packard gemessen.

b. Ergebnis und Diskussion

Die Abb. 23 zeigt, daß bei einer Gesamtkonzentration unter 1 mg γ -Globulin pro Inkubationsansatz nicht alles antikörpergebundene Testosteron ausgefällt wird. Eine Steigerung über 1 mg γ -Globulin erbringt keine wesentliche Verbesserung der Ausfällung von antikörpergebundenem Testosteron.

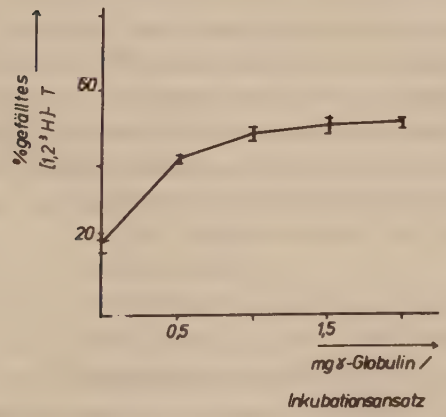

Abb. 23: Fällung von antikörpergebundenem Testosteron durch eine 30 %-ige Polyethylenglycollösung in Abhängigkeit vom Proteingehalt.
AK gegen T-7-thioäther-Arbeitstiter: 1:100 000; Standardmenge von (1,2³H)-T; γ -Globulin vom Rind

3. Der Einfluß der Trennmethode der antikörpergebundenen und freien Fraktion auf die Eichkurve bei der radioimmunologischen Testosteronbestimmung

Ziel der Versuche war es, festzustellen, welchen Einfluß die Trennmethode der antikörpergebundenen und freien Fraktion bei sonst gleichen Versuchsbedingungen auf die Form einer Eichkurve hat.

a. Versuchsdurchführung

Definierte Mengen einer inaktiven Testosteroneichkurvenlösung zwischen 0 und 500 pg Testosteron wurden mit 5670 cpm (1,2^{3}H)-Testosteron und 0,5 ml einer Testosteronantikörperlösung (Antikörper gegen Testosteron-7-thioäther-BSA, Titer 1:30 000, 2 mg δ -Globulin vom Rind der Firma Miles pro ml, 0,9 % NaCl, 0,01 % Na-acid in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4) über Nacht inkubiert. Die Trennung der gebundenen und freien Fraktion erfolgte mit 0,5 ml einer Charcoal-Dextran-Lösung (250 mg/25 mg), einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung oder einer 30 %-igen Polyethylenglycollösung. Die Radioaktivität in 0,5 ml des Überstandes nach der Abzentrifugation wurde bestimmt und die gebundenen Fraktionen des Inkubationsansatzes berechnet. Die gebundenen Fraktionen wurden in Abhängigkeit von der eingesetzten Testosteronmenge als Eichkurve aufgetragen.

b. Ergebnis und Diskussion

Wie die Abb. 24 zeigt, erbringt die Trennmethode mit Charcoal-Dextran die niedrigsten Werte für die gebundene Fraktion. Die Trennung mit Polyethylenglycoll erbringt eine etwa 5 - 10 % höhere gebundene Fraktion, wobei der prozentuale Abfall der gebundenen radioaktiven Testo-

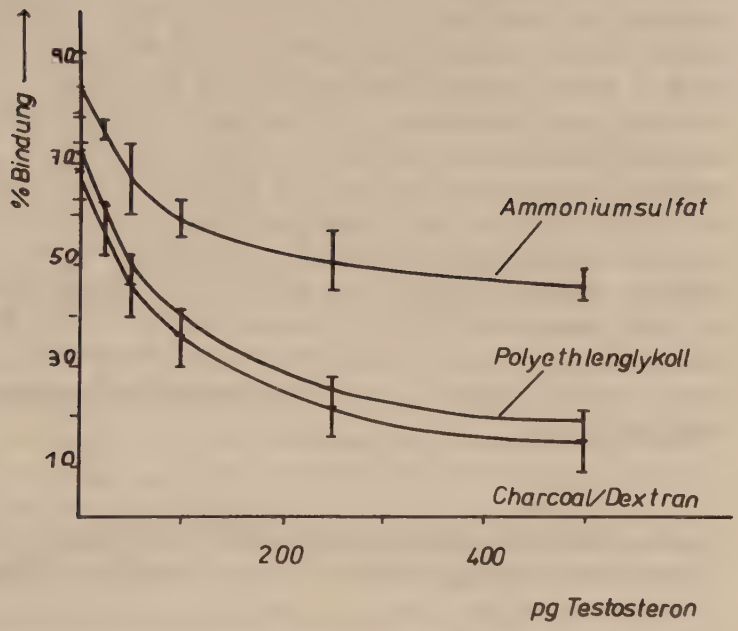

Abb. 24: Eichkurven bei der radioimmunologischen Testosteronbestimmung bei Verwendung unterschiedlicher Trennmethoden der gebundenen und freien Fraktion.
AK gegen T-7-thioäther-BSA-Arbeitstiter 1 : 30 000; Standardmenge von (1,2^{3}H)-T
Trennmethoden:
Charcoal-Dextran 250 mg/25 mg,gesättigte Ammoniumsulfatlösung
Polyethylenglycoll 30 %

steronfraktion in Abhängigkeit von der Menge des inaktiven Testosterons etwas geringer ist als bei der Trennung mit Charcoal-Dextran. Die Trennung mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung zeigt beim O-Wert eine etwa 20 % höhere Bindung. Der Abfall der gebundenen Fraktion in Abhängigkeit von der eingesetzten inaktiven Testosteronmenge ist erheblich geringer als bei der Trennung mit Charcoal-Dextran und Polyethylenglycoll. Wie die Abbildungen der Eichkurven zeigen, ergibt die Trennung mit Charcoal-Dextran die Eichkurve mit der höchsten Empfindlichkeit, die annähernd erreicht wird bei der Trennung mit Polyethylenglycoll. Durch den erheblich flacheren Abfall der Eichkurve bei Verwendung von Ammoniumsulfat ergibt sich eine wesentlich schlechtere Empfindlichkeit.

4. Der Einfluß der Trennmethode der antikörpergebundenen und freien Fraktion auf den Titer des Antiserums

Die Titerbestimmung ist wegen ihrer methodischen Einfachheit eine häufig gebrauchte Charakterisierungsmethode eines Antiserums. Ziel der Untersuchung war es festzustellen, ob die Methode der Trennung der freien und antikörpergebundenen Steroidfraktion mit Charcoal-Dextran, Polyethylenglycoll und Ammoniumsulfat einen Einfluß auf die Bestimmung des Titers hat.

a. Versuchsdurchführung

Es wurde von einem Antiserum gegen Testosteron-7-thioäther-BSA eine Verdünnungsreihe hergestellt. (Titer 1:1000 bis 1:70 000). Zur Verdünnung wurde eine 0,1 M Phosphatpufferlösung pH 7,4 mit 2 mg γ -Globulin vom Rind der Firma Miles, 0,9 % NaCl und 0,01% Natriumazid verwendet. Je 9 Proben von 0,5 ml der einzelnen Verdünnungsstufen

wurden mit 11 500 cpm (1,2^{3}H)-Testosteron über Nacht inkubiert. Die Trennung der antikörpergebundenen und freien Fraktion je einer Verdünnungsreihe wurde durch Zugabe von 0,5 ml Charcoal-Dextran Lösung (250 mg/25 mg), einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung und einer 30 %-igen Polyäthylenglycollösung durchgeführt. Durch Messung von 0,5 ml des Überstandes nach Abzentrifugieren wurde die Größe der gebundenen Fraktion in den einzelnen Verdünnungsstufen berechnet. Nach der Definition des Titers wurde die Verdünnung bestimmt, bei der 50 % der eingesetzten Radioaktivität gebunden wird.

b. Ergebnis und Diskussion

Wie die Abb. 25 zeigt, wird bei der Trennung mit Charcoal-Dextran in allen Verdünnungsstufen eine gegenüber der Trennung mit Polyethylenglycoll 3 % niedrigere Fraktion gefunden. Die beiden Kurven der prozentual gebundenen Anteile verlaufen in etwa parallel. Bei der Trennung mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung findet sich bei der Verdünnung 1:1 000 eine gegenüber der Trennung mit Charcoal-Dextran 15 % höhere Bindung. Im weiteren Verlauf der Verdünnung verringert sich der Anteil der gebundenen Fraktion nicht in dem Ausmaß wie bei Verwendung von Charcoal-Dextran und Polyethylenglycoll, so daß die gebundene Fraktion bei der Verdünnung 1 : 70 000 30 % über der von Charcoal-Dextran liegt. Der Abfall der gebundenen Fraktion verlangsamt sich so sehr, daß im untersuchten Bereich sich ein zur Abszisse paralleler Kurvenverlauf ergibt, der den Anteil der 50 %-igen Bindung nicht unterschreitet, so daß eine Titerbestimmung in dem untersuchten Verdünnungsbereich nicht möglich ist. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Methode der Trennung der gebundenen und freien Fraktion einen wesentlichen Einfluß auf den Wert des Titers hat. Während bei Verwendung von Charcoal-Dextran

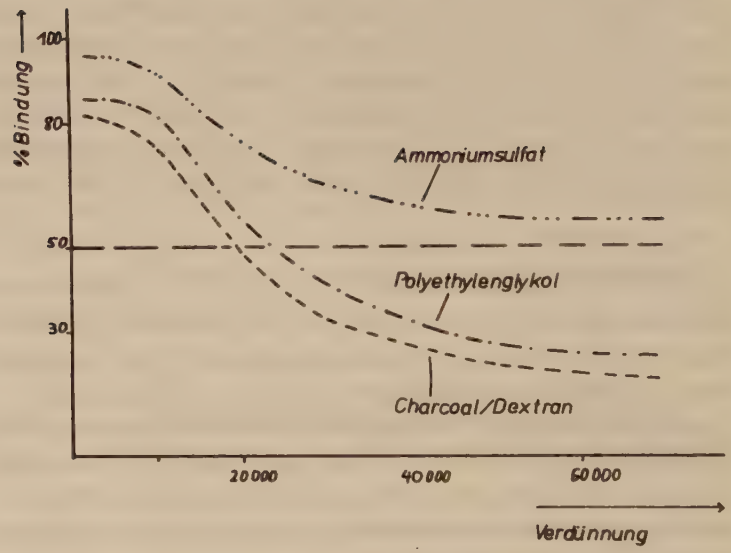

Abb. 25: Titerbestimmung eines Antiserums bei Verwendung drei verschiedener Methoden der antikörpergebundenen und freien Testosteronfraktion.

AK gegen T-7-thioäther-BSA; Proteinzusatz 1 mg/Inkubationsansatz ♂ -Globulin Miles; Zusatz von 11 500 cpm (1,2^{3}H)-T.

und Polyethylenglycoll der Wert noch in einer vergleichbaren Größenordnung liegt, ist bei der von uns verwendeten Versuchsanordnung eine Titerbestimmung mit Ammoniumsulfatausfällung überhaupt nicht möglich, bei Modifikation der Versuchsanordnung sind erheblich differente Werte zu erwarten.

5. Methodische Streuung der Ergebnisse der Messung der gebundenen Fraktion bei Verwendung von Charcoal-Dextran, Polyethylenglycoll und Ammoniumsulfat zur Trennung der gebundenen und freien Fraktion

Ziel der Untersuchung war es, festzustellen, durch welche der Trennmethoden die geringste Streuung der Ergebnisse erreicht wird.

a. Versuchsdurchführung

Je 32 Proben von 0,5 ml Antikörperlösung (Testosteron-7-thioäther in Phosphatpuffer) wurden wie früher beschrieben mit 11 000 cpm (1,2^{3}H)-Testosteron über Nacht bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Trennung der gebundenen und freien Fraktion mit 0,5 ml Charcoal-Dextran (250 mg/25 mg in 100 ml Phosphatpuffer pH 7,4), Polyethylenglycoll- oder gesättigter Ammoniumsulfatlösung. Die Radioaktivität von 0,5 ml des Überstandes nach dem Abzentrifugieren wurde gemessen. Die jeweils gebundene Fraktion wurde berechnet und gleich 100 % gesetzt. Der Mittelwert und die Streuung wurden bestimmt. Er betrug für Charcoal-Dextran $x = 100 \pm 1{,}2$ %, für Polyethylenglycoll $x = 100 \pm 2{,}02$ % und für Ammoniumsulfat $x = 100 \pm 1{,}5$ %. Das Ergebnis zeigt, daß sich der durch die Streuung der Methode bedingte Fehler bei allen drei Methoden nicht wesentlich unterscheidet. Die etwas höhere Streuung bei Verwendung von Polyethylenglycoll dürfte durch Pipettierschwierigkeiten der viskösen Lösung erklärt sein.

6. Die Stabilität der antikörpergebundenen und freien Testosteronfraktion im Radioimmunoassay in Abhängigkeit von der Dauer der Einwirkung von Kohle, Polyethylenglycoll oder Ammoniumsulfat bei der Trennung der gebundenen und freien Fraktion

Bei Vorliegen einer großen Anzahl von Proben im Radioimmunoassay ergibt sich bei der Trennung der gebundenen und freien Fraktion die Schwierigkeit, daß bei manueller Zupipettierung von Charcoal-Dextran, Polyethylenglycoll oder Ammoniumsulfat die Proben unterschiedlich lange bis zum Abzentrifugieren mit diesen Substanzen behandelt worden sind. Ziel des Versuches war es, die Größenordnung des dadurch entstandenen Fehlers festzustellen.

a. Versuchsdurchführung

In einem ersten Versuch wurden zwischen 30 und 40 Proben mit je 0,5 ml Testosteronantikörper (Testosteron-7-thioäther in Phosphatpuffer) und einer radioaktiven Standarddosis von 11 000 cpm (1,2^{3}H)-Testosteron über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde durch Zugabe von 0,5 ml a) Charcoal-Dextran (250 mg/25 mg), b) 30 %-iges Polyethylenglycoll, c) gesättigter Ammoniumsulfatlösung, die gebundene von der freien Fraktion getrennt. Je 5 der unterschiedlich behandelten Proben wurden sofort in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert und je 5 wurden nach 15 Min. abzentrifugiert. Die Radioaktivität von 0,5 ml des Überstandes wurden gemessen und die Fraktion als Prozent des inkubierten Testosterons berechnet.
In weiteren Versuchen wurden je zwischen 30 und 40 Proben von 0,5 ml Testosteron-7-thioäther mit 10 500 cpm (1,2^{3}H)-Testosteron inkubiert. Bei den Versuchen mit Charcoal-Dextran wurde auch Antiserum gegen Testosteronglycinhydrazid-BSA, Testosteron-hemisuccinat-BSA und Aldosteron-21-hemisuccinat-BSA in gleicher Weise über Nacht inkubiert.

Nach Zugabe von Charcoal-Dextran, Polyethylenglycoll oder Ammoniumsulfat wurde ein Teil der Proben nach 5 Min., 10 Min., 20 Min., 30 Min. und 60 Min. abzentrifugiert. Die Radioaktivität des Überstandes wurde gemessen und die gebundene Fraktion berechnet.

b. Ergebnis und Diskussion

Wie die Tab.11a zum ersten Versuch zeigt, ist bei sofortigem Abzentrifugieren die gebundene Fraktion bei Verwendung von Polyethylenglycoll und Charcoal-Dextran unabhängig von der Art der Trennmethode etwa gleich, bei Verwendung von Ammoniumsulfat 20 % höher. Bei Verwendung von Charcoal-Dextran ist die gebundene Fraktion nach 15 Min. mit 8 % signifikant niedriger, bei Polyethylenglycoll und Ammoniumsulfat hat sich die Größe der gebundenen Fraktion nicht geändert.

	A	B
Charcoal-Dextran 250 mg/25 mg	53,9 % ± 1,1	45,9 % ± 0,7
Polyethylenglycoll 30 %-ig	50,8 % ± 1,7	51,5 % ± 1,6
Ammoniumsulfat	69,7 % ± 2,1	71,5 % ± 2,1

Tab. 11a: Stabilität der antikörpergebundenen und freien Testosteronfraktion in Abhängigkeit von der Dauer der Einwirkung von Charcoal-Dextran, Polyethylenglycoll und Ammoniumsulfat nach A) sofortigem Abzentrifugieren B) Abzentrifugieren nach 15 Min. stehen lassen; angegeben in Prozent der jeweils zugesetzten Gesamtaktivität

Im zweiten Versuch zeigt die Tab.11b, daß die gebundene Fraktion bei Verwendung von Polyethylenglycoll und Ammoniumsulfat sich auch nach 30 und 60 Min. im Vergleich zum 5-Min. Wert nicht verändert hat. Bei Verwendung von Charcoal-Dextran liegt nach 60 Min. die gebundene Fraktion im Vergleich zum 5-Min. Wert um 10 - 30 % niedriger. Zusammenfassend zeigen beide Versuche, daß die Dauer der Einwirkung von Polyethylenglycoll und Ammoniumsulfat keinen Einfluß auf die Größe der gebundenen und freien Fraktion hat.
Bei Verwendung von Charcoal-Dextran verringert sich zeitabhängig die Größe der gebundenen Fraktion.
Offensichtlich wurde durch Charcoal-Dextran in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer antikörpergebundenes Steroid vom Antikörper abgelöst und durch die Kohle adsorbiert oder Antikörper mit gebundenem Steroid adsorbiert.

7. Die Stabilität der antikörpergebundenen Testosteronfraktion nach Abzentrifugieren mit Charcoal-Dextran

Da nach Trennung der freien und gebundenen Testosteronfraktion mit Charcoal-Dextran beim Abpipettieren der einzelnen Fraktionen mindestens eine Zeit von 20 Min. zwischen dem Abpipettieren der ersten und letzten Probe vergeht (bei etwa 50 Proben) wurde untersucht, welchen Einfluß eine solche Verzögerung auf die Stabilität der gebundenen Fraktion hat.

a. Versuchsdurchführung

30 Proben mit je 0,5 ml Testosteron-Antikörper wurden wie früher beschrieben mit (1,2^{3}H)-Testosteron inkubiert und die Trennung der gebundenen und freien Fraktion durch Charcoal-Dextran durchgeführt. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Überstand von 10 Proben direkt, von weiteren 10 Proben nach 15 Min. und 30 Min. abpipettiert

	Antiserum	5 Min %	10 Min %	15 Min %	20 Min %	30 Min %	60 Min %
Charcoal-Dextran	Testosteron-glycin-hydrazid (n=10)	99,9±10,2	94,1±6,4	95,6±7,1	-	93,6±8.6	84,3±9,0
	Testosteron-glycin-hydrazid	99,1±2,1	98,4±5,6	92,1±2,0	-	83,2±1,1	70,5±1,3
	Testosteron-hemi-succinat (n=10)	99,9±1,9	99,4±1,5	98,3±2,1	98,7±2,5	96,1±1,5	91,6±3,9
	Testosteron-7-thio-äther (n=8)	99,9±1,1	98,4±3,6	95,9±4,1	96,4±1,5	94,4±1,6	88,3±1,9
	Aldosteron-21-hemi-succinat (n=8)	99,8±4,1	95,2±5,6	91,5±4,2	89,5±5,9	85,5±3,6	73,2±6,8
gesättigte Ammonium-sulfatlsg.	Testosteron-7-thio-äther (n=6)	99,9±4,5	99,5±6,4	101,6±2,1	97,5±10,3	101,3±5,0	102,5±4,2
30 %-ige Poly-äthylenglyc-ollösung	Testosteron-7-thio-äther	99,9±4,4	100,0±7,7	102,0±3,1	101,1±0,98	100,3±3,1	99,0±4,1

Tab. 11b: Stabilität der Testosteronbindung an Antikörper in Gegenwart von Charcoal/Dextran (125 mg/25 mg); Polyethylenglycoll 30 %-ig und gesättigte Ammoniumsulfatlösung in Abhängigkeit von der Kontaktzeit
(Trennung der antikörpergebundenen und freien Fraktion durch Zugabe von Charcoal/Dextran, Polyethylenglycoll und Ammoniumsulfat und zeitlich unterschiedliche Einwirkungsdauer bis zum Abzentrifugieren (5-60 Min). Bei den Versuchen mit Charcoal-Dextran Verwendung von AK gegen T-7-thioäther-BSA; T-glycinhydrazid-BSA; Testosteron-hemisuccinat-BSA und Aldosteron-21-hemisuccinat-BSA; bei Verwendung von Ammoniumsulfatlösung und Polyethylenglycoll: Antiserum gegen T-7-thioäther-BSA. n = Anzahl der Bestimmungen; Angaben in Prozent der jeweils zugesetzten Gesamtaktivität)

und die Radioaktivität gemessen. Die gebundene Fraktion der nach 15 und 30 Min. abzentrifugierten Proben wurde in Prozent des Mittelwertes der sofort abpipettierten Proben ausgewertet.

b. Ergebnis und Diskussion

15 Min. nach dem Abzentrifugieren betrug die gebundene Fraktion $x_{15} = 98,9\ \% \pm 1,9$; 30 Min. nach dem Abzentrifugieren $x_{30} = 96,5\ \% \pm 2,3$. Das Ergebnis zeigt, daß in der angegebenen Zeit eine geringfügige Abnahme der gebundenen Fraktion erfolgt.

8. Einfluß der Temperatur auf die Trennung der antikörpergebundenen und freie Testosteronfraktion durch Charcoal-Dextran

Da der Arbeitsgang der Trennung von freier und antikörpergebundener Testosteronfraktion nicht ausschließlich im Kühlraum durchgeführt werden konnte, wurde untersucht, welchen Einfluß kurzfristige Erwärmung der Proben nach Zugabe von Charcoal-Dextran auf die Bindung hat.

a. Versuchsdurchführung

Es wurden 32 Proben von je 0,5 ml Testosteronantikörper (Testosteron-7-thioäther Antiserum) mit einer radioaktiven Testosteronmenge von 15 000 cpm (1,2^{3}H)-Testosteron über Nacht bei 4° C inkubiert. Die Trennung der antikörpergebundenen und freien Fraktion erfolgte durch Zugabe von 0,5 ml Charcoal-Dextran (250 mg/25 mg). Danach wurden je 6 Proben 1 Min., 3 Min. und 6 Min. bei Zimmertemperatur erwärmt, während 6 Proben in den 15 Min. bis zu Abzentrifugieren bei 4° C im Kühlschrank standen. Die Radioaktivität von 0,5 ml des Überstandes wurden nach

dem Abzentrifugieren in einer Kühlzentrifuge in einem Packard gemessen. Die gebundene Fraktion der erwärmten Probe wurde in Prozent der durchschnittlich gebundenen Fraktion der nicht erwärmten Proben berechnet.

b. Ergebnis und Diskussion

Es zeigte sich, daß bei einminütiger Erwärmung x_1 = 98,2 % $\pm$ 1,2; bei 3 min. Erwärmung x_6 = 94,5 $\pm$ 2,6 % der nicht erwärmten Proben gebunden war.
Es ist zu sehen, daß eine kurzfristige Erwärmung zu einer mäßiggradigen Erniedrigung der gebundenen Fraktion führt.

9. Der Einfluß der Dextrankonzentration auf die Stabilität der Testosteron-Antikörper-Bindung

Ziel des Versuches war es, festzustellen, ob eine Erhöhung der Charcoal-Dextran-Konzentration die Stabilität der Bindung beeinflußt. Die Zugabe von Dextran erfolgte, um eine Anlagerung von Antikörpern an die Kohle zu verhindern.

a. Versuchsdurchführung

24 Proben mit 0,5 ml Antikörperlösung (Testosteronglycinhydrazid BSA) wurde mit 10 400 cpm (1,2^{3}H)-Testosteron über Nacht inkubiert. Von je 8 Proben erfolgte die Trennung der gebundenen und freien Fraktion durch Zugabe von 0,5 ml der folgenden Charcoal-Dextran Lösungen: 1) 250 mg Norit A + 25 mg Dextran in 100 ml Phosphatpuffer, 2) 250 mg Norit A + 125 mg Dextran in 100 ml Phosphatpuffer und 3) 250 mg Norit A + 250 mg Dextran in 100 ml Phosphatpuffer. Nach dem Abzentrifugieren wurde die Radioaktivität von 0,5 ml des Überstandes gemes-

sen und das arithmetische Mittel der Werte gebildet.

b. Ergebnis und Diskussion

Bei Verwendung von 25 mg Dextran betrug die Radioaktivität der gebundenen Fraktion in 0,5 ml Überstand x_{25} = 1263 cpm $\pm$ 55, bei Verwendung von 125 mg Dextran x_{125} = 1284 cpm $\pm$ 29 und bei Verwendung von 225 mg Dextran x_{225} = 1294 cpm $\pm$ 52. Das Ergebnis zeigt, daß die Dextrankonzentration keinen Einfluß auf die Stabilität der Bindung hat und daß kein Einfluß auf eine eventuelle Anlagerung von Antikörper an die Kohle erkennbar ist.

V. Untersuchungen zur unspezifischen Bindung von Testosteron an Proteine bei der radioimmunologischen Bestimmung

1. Vergleich der unspezifischen Bindung von Testosteron an verschiedene Proteine

Im radioimmunologischen Inkubationsansatz ist es üblich, neben der hochverdünnten Antikörperlösung eine Proteinlösung im Überschuß zuzugeben (9), um einmal eine Adsorption an die Glaswände, zum anderen eine stärkere Adsorption der Antikörper an die Charcoal-Lösung bei der Trennung der freien und gebundenen Antikörper zu verhindern, drittens um ein quantitatives Ausfällen der Proteine bei der Verwendung von Ammoniumsulfat oder Polyethylenglycoll zur Trennung der gebundenen und freien Fraktion zu ermöglichen. Ziel des Versuches war es, herauszufinden,welche Art von Proteinen für diesen Zweck am besten geeignet ist.

a. Versuchsdurchführung

Es wurden Lösungen hergestellt, die entweder 0; 0,5; 1; 1,5 oder 2 mg in 0,5 ml die folgenden Proteine gelöst hatte: Albumin (Merck), Lysozym (Merck), δ -Venin (Behringwerke), Intraglobin (Biotest), γ-Globulin Mensch (Serva), γ -Globulin Rind (Serva). Die Proteine waren in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 (0,5 % NaCl, 0,01 % Natriumazid) gelöst. Je 12 Proben der gleichen Konzentration eines Proteins wurden mit 10 000 cpm (1,2^{3}H)-Testosteron über Nacht inkubiert. Die Trennung der gebundenen und freien Fraktion erfolgte für je 4 Proben entweder mit Charcoal-Dextran (250 mg/25 mg), mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung (42,6 g in Phosphatpuffer) oder mit einer 30 %-igen Polyethylenglycollösung unter gleichen früher

beschriebenen Versuchsbedingungen. Die gebundene Fraktion wurde in Prozent der gesamten eingesetzten radioaktiven Testosteronmenge berechnet.

b. Ergebnis und Diskussion

Wie die Tab. 12 zeigt, ist bei Verwendung von Charcoal-Dextran die geringste Menge von Testosteron unspezifisch an die eingesetzten Proteine gebunden. Ein hoher Anteil ist bei der Verwendung von Ammoniumsulfat gebunden, ein geringerer, aber deutlich höherer Anteil als bei der Verwendung von Charcoal-Dextran,ist bei Verwendung von Polyethylenglycoll an die Proteine gebunden. Für alle Proteine besteht eine Abhängigkeit der Bindung von der Konzentration des Proteins, des weiteren ist die Größe der Bindung beeinflußt von der Art des verwendeten Proteins, wobei insbesondere das γ-Globulin Rind (Serva) sich durch eine hohe Bindung von Testosteron auszeichnet, die sogar bei Charcoal-Dextran und Einsatz von 2 mg Protein 1/3 der eingesetzten Testosteronmenge beträgt. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die niedrigste unspezifische Bindung bei Verwendung von Charcoal-Dextran auftritt, eine nicht zu vernachlässigende hohe bei Ammoniumsulfat und daß das verwendete Protein für die Bindung von Bedeutung ist.

2. Vergleich der unspezifischen Bindung an γ-Globulin vom Rind bei Verwendung der Präparate verschiedener Firmen

Da wir im vorangegangenen Versuch die höchste unspezifische Bindung von γ -Globulin erhalten haben, und weiterhin allgemein γ -Globulin bevorzugt als Fällungsprotein im RIA verwendet wird, haben wir untersucht, ob die von verschiedenen Firmen lieferbaren γ -Globuline sich

	mg Protein/ Ansatz	Charcoal/ Dextran %	Ammonium-sulfat %	Polyethylen-glycoll %
Albumin	0	1,6 ± 0,2	19,1 ± 3,4	5,6 ± 5,3
	0,5	2,2 ± 0,2	10,5 ± 0,8	9,8 ± 1,6
	1	2,3 ± 0,3	9,4 ± 2,2	7,0 ± 5,6
	1,5	2,4 ± 0,2	5,0 ± 4,4	9,5 ± 2,4
	2	2,7 ± 0,3	6,3 ± 3,9	8,0 ± 5,9
Lysozym	0	1,6 ± 0,3	16,4 ± 6,9	8,4 ± 3,8
	0,5	1,7 ± 0,4	18,6 ± 6,5	10,5 ± 2,8
	1	1,7 ± 0,3	21,1 ± 9,3	10,2 ± 1,4
	1,5	1,7 ± 0,4	38,7 ± 5,0	8,4 ± 5,6
	2	1,8 ± 0,3	48,2 ± 5,5	8,3 ± 0,9
γ -Venin	0	1,6 ± 0,3	20,0 ± 3,6	8,2 ± 1,8
	0,5	1,9 ± 0,4	25,0 ± 1,8	10,7 ± 2,5
	1	1,8 ± 0,3	29,7 ± 2,5	7,8 ± 4,3
	1,5	1,9 ± 0,4	35,3 ± 1,5	6,8 ± 4,0
	2	1,8 ± 0,4	37,3 ± 3,6	11,4 ± 3,5
Intraglobin	0	1,5 ± 0,3	19,1 ± 10,0	10,0 ± 1,1
	0,5	1,8 ± 0,3	27,3 ± 7,1	10,2 ± 1,5
	1	1,7 ± 0,3	32,5 ± 3,0	6,5 ± 4,1
	1,5	1,8 ± 0,2	32,1 ± 1,6	7,3 ± 5,5
	2	1,9 ± 0,4	37,5 ± 2,9	8,5 ± 1,8
γ -Globulin Mensch	0	1,5 ± 0,3	23,3 ± 4,5	8,4 ± 3,7
	0,5	1,8 ± 0,4	36,1 ± 5,8	8,4 ± 1,3
	1	2,1 ± 0,5	40,4 ± 5,0	12,3 ± 4,7
	1,5	2,3 ± 0,3	47,8 ± 3,2	10,3 ± 4,6
	2	2,4 ± 0,4	52,2 ± 2,5	14,8 ± 7,2
γ -Globulin Rind	0	1,6 ± 0,3	20,9 ± 8,0	9,6 ± 2,4
	0,5	7,9 ± 2,3	59,0 ± 5,8	8,9 ± 1,8
	1	16,6 ± 2,9	78,5 ± 4,2	8,8 ± 2,4
	1,5	20,8 ± 3,2	84,1 ± 4,8	14,7 ± 3,0
	2	34,0 ± 4,2	86,7 ± 3,7	21,9 ± 2,8

Tab. 12: Vergleich der unspezifischen Bindung von Testosteron an verschiedene Proteine bei Trennung der antikörpergebundenen und freien Steroidfraktion mit Charcoal/Dextran (250 mg/25 mg), gesättigte Ammoniumsulfatlösung, Polyethylenglycoll 30 %

(Zugabe von je 0; 0,5; 1; 1,5 und 2 mg Protein zum Inkubationsansatz;
Standardmenge an (1,2^{3}H)-T; Angaben in Prozent der gesamten eingesetzten radioaktiven Testosteronmenge)

in ihrer unspezifischen Bindung unterscheiden.

a. Versuchsdurchführung

Es wurden γ-Globuline der Firma Serva, Mann, Sigma und Miles in einer Konzentration von 0,5; 1; 1,5 und 2 mg Protein pro Inkubationsansatz (in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4) mit je etwa 10 000 cpm (1,2^{3}H)-Testosteron inkubiert. Pro Protein, Proteinkonzentration und Trennungsverfahren wurden 4 Ansätze inkubiert. Die Trennung der gebundenen und freien Steroide erfolgte mit 0,5 ml Charcoal-Dextran, gesättigter Ammoniumsulfatlösung oder 30 %-igem Polyethylenglycoll in der früher beschriebenen Weise.

b. Ergebnis und Diskussion

Wie die Tab. 13 zeigt, wird für alle Proteinkonzentrationen und bei den drei Trennverfahren die niedrigste Bindung bei γ-Globulin Miles gefunden. Etwas stärker binden die γ-Globuline von Sigma und Mann, eine erhebliche Bindung zeigen die γ-Globuline von Serva. Die Bindung an das γ-Globulin von Serva ist so stark, daß eine Verunreinigung des γ-Globulins der Firma Serva mit spezifisch bindendem Protein (testosteronbindendes Globulin = β_2-Globulin?) vermutet werden kann. Dieses Verhalten zeigten verschiedene von uns bestellte Chargen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß käufliche γ-Globuline eine solche Bindungsfähigkeit für Steroide haben können, daß die Eichkurve des spezifisch bindenden Proteins gestört wird, weswegen die Bindungsfähigkeit vor der Anwendung bei der radioimmunologischen Steroidbestimmung überprüft werden muß.

ϒ -Globulin	mg Protein/ Ansatz	Charcoal/ Dextran %	Ammonium-sulfat %	Polyethylen-glycoll %
Miles	0,5	2,4 ± 0,5	32,7 ± 3,0	14,4 ± 1,9
	1	2,8 ± 0,7	41,2 ± 4,6	14,3 ± 2,3
	1,5	3,2 ± 0,3	47,3 ± 3,3	9,6 ± 5,6
	2	3,6 ± 0,5	50,4 ± 1,1	12,0 ± 5,6
Sigma	0,5	3,2 ± 0,6	28,6 ± 9,8	12,3 ± 4,0
	1	3,9 ± 0,9	43,6 ± 1,4	16,4 ± 1,4
	1,5	4,9 ± 0,6	52,7 ± 2,1	13,3 ± 5,4
	2	5,5 ± 1,2	60,7 ± 2,6	15,1 ± 6,4
Mann	0,5	3,5 ± 0,8	34,2 ± 2,4	10,7 ± 3,7
	1	4,1 ± 0,5	48,1 ± 4,9	15,2 ± 4,4
	1,5	5,1 ± 1,0	55,5 ± 3,5	17,0 ± 9,5
	2	6,1 ± 1,4	59,8 ± 2,3	20,8 ± 2,9
Serva	0,5	10,9 ± 2,5	56,5 ± 7,0	17,1 ± 4,5
	1	18,9 ± 2,1	77,2 ± 7,6	23,6 ± 5,4
	1,5	19,8 ± 1,6	84,9 ± 4,1	24,7 ± 7,3
	2	24,0 ± 1,0	89,7 ± 1,8	32,1 ± 4,6

Tab. 13: Vergleich der unspezifischen Bindung von Testosteron an ϒ -Globulin verschiedener Firmen bei Trennung der antikörpergebundenen und freien Steroidfraktion mit Charcoal/Dextran (250 mg/25 mg), gesättigte Ammonium-sulfatlösung; 30 %-ige Polyethylenglycollösung

(Zugabe von je 0; 0,5; 1; 1,5 und 2 mg Protein zum Inkubationsansatz;
Standardmenge an (1,2^{3}H)-T; Angaben in Prozent der gesamten eingesetzten radioaktiven Testosteronmenge)

3. Der Einfluß des bei der radioimmunologischen Inkubation zugesetzten Proteins und der Trennmethoden mit Charcoal-Dextran, Polyethylenglycoll und Ammoniumsulfat auf die Testosteroneichkurve

Ziel der Untersuchung war es festzustellen, welches der von uns untersuchten sechs Proteine bei Zusatz zum radioimmunologischen Inkubationsansatz die besten Eichkurven ergibt. Diese Fragestellung wurde für drei von uns verwendete Trennmethoden der gebundenen und freien Fraktion untersucht.

a. Versuchsdurchführung

Es wurden von den käuflich erworbenen Proteinen, γ-Globulin Rind (Serva), Lysozym (Merck), Rinderalbumin (Merck), Intraglobin (Biotest), γ-Venin (Behringwerke) und γ-Globulin vom Mensch (Serva), Lösungen in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,5) mit Proteinkonzentrationen von 1 mg in 0,2 ml hergestellt. Weiterhin wurde eine Antikörperlösung (Testosteron-7-thioäther BSA, Arbeitstiter 1:100 000) in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4, 09 % NaCl und 0,1 % Natriumazid) hergestellt. Je 10 000 cpm (1,2^{3}H)-Testosteron, Aliquots einer Eichkurvenlösung von 0; 100 und 250 pg inaktiven Testosterons pro Inkubationsansatz, 0,3 ml der Antikörperlösung und 0,1 ml der verschiedenen Proteinlösungen wurden entweder mit 0,5 ml Charcoal-Dextran (250 mg/50 mg), mit 0,5 ml einer 30 %-igen Polyethylenglycollösung oder mit 0,5 ml einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung zur Trennung der freien und gebundenen Fraktionen behandelt. Nach Abzentrifugieren in einer Kühlzentrifuge wurde die Radioaktivität von 0,5 ml des Überstandes gemessen. Die gebundene Fraktion wurde entweder in Prozent der zugegebenen Radioaktivität oder in Prozent des 0-Wertes ohne inaktives Testosteron berechnet.

b. Ergebnis und Diskussion

Wie die Tab. 14 zeigt, ergibt sich bei Verwendung von Charcoal-Dextran bei allen Proteinen eine annähernd gleich gebundene Fraktion im O-Wert (63 - 70 % des zugegebenen radioaktiven Testosterons). Auch der Abfall der Eichkurve bis zur Zugabe von 250 pg inaktivem Testosteron unterscheidet sich außer bei Verwendung von γ-Globulin vom Rind (Serva) mit signifikant geringerem Abfall wenig. Ohne statistische Absicherung scheint der Zusatz von Lysozym und Albumin die beste Eichkurve zu ergeben. Bei Verwendung von Polyethylenglycoll ergibt sich im O-Wert wie früher nachgewiesen gegenüber Charcoal-Dextran für γ-Venin, γ-Globulin vom Rind und γ-Globulin vom Mensch und Intraglobin eine mäßiggradig höhere, oder eine etwa gleich große Bindung (68 - 77 % des eingesetzten radioaktiven Testosterons); Albumin und Lysozym, die bereits optisch bei der Trennung keine ausreichende Proteinfällung zeigen, binden nur 23 bzw. 26 % des eingesetzten radioaktiven Testosterons im Überstand. Der Abfall der Eichkurve ist für γ-Venin, γ-Globulin vom Mensch und Intraglobin entsprechend der Trennung mit Charcoal-Dextran, für γ-Globulin vom Rind zeigt sich analog zum Charcoal-Dextran ein geringerer Abfall der Eichkurve. Trotz der niedrigeren Bindung ergibt sich bei Albumin und Lysozym eine zwar schlechtere aber doch brauchbare Eichkurve.

Bei Verwendung von Ammoniumsulfat zur Trennung der gebundenen und freien Fraktion, zeigt sich im O-Wert für γ-Globulin vom Rind, γ-Globulin vom Mensch, Intraglobin und γ-Venin, die in etwa 20 % gegenüber Charcoal-Dextran erhöht gebundene Fraktion (82 - 89 %). Für Lysozym und Albumin, bei denen sich, soweit optisch beurteilbar keine ausreichende Proteinfällung zeigte, ergaben sich im O-Wert eine Bindung des radioaktiven Testosterons von 63 bzw. 36 %. Im Vergleich zu Charcoal-Dextran zeigte sich bei Intraglobin, γ-Globulin vom Mensch und γ-Venin ein

	Steroidkonzentration (pg)	Charcoal-Dextran %	Ammoniumsulfat %	Polyethylenglycoll %
Lysozym	0	67,1 ± 3,6	63,8 ± 4,7	26,4 ± 2,1
	100	32,1 ± 1,4	38,1 ± 2,0	15,8 ± 0,7
	250	22,3 ± 2,2	30,0 ± 1,5	10,3 ± 1,8
Albumin	0	70,4 ± 2,9	36,3 ± 2,4	23,1 ± 1,6
	100	33,7 ± 1,9	19,5 ± 1,5	12,4 ± 3,2
	250	23,8 ± 1,0	14,3 ± 3,2	10,6 ± 1,5
δ -Venin	0	67,0 ± 2,2	82,4 ± 4,3	68,3 ± 4,0
	100	33,9 ± 1,4	51,5 ± 3,8	33,5 ± 4,0
	250	22,7 ± 1,2	43,9 ± 1,4	23,2 ± 0,8
Intraglobin	0	66,9 ± 3,5	84,5 ± 3,0	74,2 ± 2,8
	100	31,9 ± 2,8	54,8 ± 1,8	37,1 ± 2,5
	250	21,8 ± 2,6	46,8 ± 2,8	24,8 ± 2,1
δ -Globulin Mensch	0	69,1 ± 2,0	86,1 ± 3,6	77,4 ± 4,8
	100	34,4 ± 1,0	60,5 ± 3,9	41,4 ± 4,1
	250	23,0 ± 1,1	53,7 ± 3,3	28,7 ± 2,0
γ -Globulin Rind	0	63,9 ± 0,7	89,5 ± 1,7	70,8 ± 2,9
	100	38,4 ± 2,4	79,9 ± 1,5	46,5 ± 3,6
	250	28,9 ± 2,9	72,0 ± 2,7	33,9 ± 1,4

Tab. 14: Einfluß verschiedener, dem Inkubationsansatz mit dem spezifischen Antikörper zugesetzten Proteine und Trennung der antikörpergebundenen und freien Steroidfraktion mit Charcoal/Dextran (250 mg/50 mg) Polyethylenglycoll 30 %-ig und gesättigter Ammoniumsulfatlösung

(Proteinkonzentration der unterschiedlichen käuflichen Proteine: 1 mg/0,2ml; AK gegen T-7-thioäther-BSA; Arbeitstiter: 1:100 000; Angaben in Prozent der zugegebenen Radioaktivität)

erheblich schlechterer Abfall der Eichkurve. Nahezu unbrauchbar für eine Eichkurve war der Abfall bei Zusatz von δ -Globulin vom Rind. Trotz der im O-Wert deutlich schlechteren Bindung bei Zusatz von Lysozym und Albumin zeigten diese beiden Proteine den stärksten Abfall der Eichkurve. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich bei Ammoniumsulfatlösung bei allen untersuchten Proteinen Eichkurven mit deutlich schlechterer Empfindlichkeit als bei Verwendung von Polyethylenglycoll und Charcoal-Dextran ergeben. Bei Verwendung von Polyethylenglycoll als Trennmethode ergibt Albumin und Lysozym bei niedriger gebundener Fraktion schlechte Eichkurven, während die weiteren Proteine Eichkurven ergeben, die etwa denen bei Charcoal-Dextran entsprechen. Insgesamt erbringt die Trennung mit Charcoal-Dextran die besten Eichkurven, wobei nur die Verwendung von δ -Globulin vom Rind (Serva) schlechtere Eichkurven ergibt. Aus dem Gesagten ergibt sich, daß trotz einiger Vorteile von Ammoniumsulfat (kein Einfluß der Einwirkungsdauer auf die Größe der gebundenen und freien Fraktion) die Verwendung von Ammoniumsulfat bei der Trennung schlechtere Ergebnisse erbringen muß. Charcoal-Dextran erbringt im Schnitt die besten Ergebnisse, bei einigen Proteinen sind die Eichkurven bei Verwendung von Polyethylenglycoll nur wesentlich schlechter.

4. Die Bindung von Testosteron und 5-α-Dihydrotestosteron an δ-Globulin vom Rind, Albumin und Lysozym

Ziel der Untersuchung war es festzustellen, ob sich bei den drei untersuchten Proteinen die Bindung der beiden Steroide im radioimmunologischen Inkubationsansatz bei Trennung mit Charcoal-Dextran unterscheiden. Es wurden je 25 000 cpm der beiden (1,2^{3}H)-Steroide mit 0,5 ml einer entsprechenden Proteinlösung (2 mg/ml) über Nacht

inkubiert. Die Trennung der gebundenen und freien Fraktion erfolgte mit Charcoal-Dextran. Die Radioaktivität von 0,5 ml des Überstandes wurde nach dem Abzentrifugieren gemessen und der gebundene Anteil der eingesetzten Radioaktivität ermittelt. Wie die Abb. 26 zeigt, wird ein erheblich höherer Betrag von 5-α-Dihydrotestosteron an die eingesetzten Proteine gebunden. Die niedrigste Bindung überhaupt, ohne Unterschied für Testosteron und 5-α DHT, zeigt Lysozym. Wegen dieses Bindungsverhaltens und der relativ besten Eichkurve bei Verwendung von Charcoal-Dextran als Trennmethode empfiehlt sich die Verwendung von Lysozym im radioimmunologischen Inkubationsansatz.

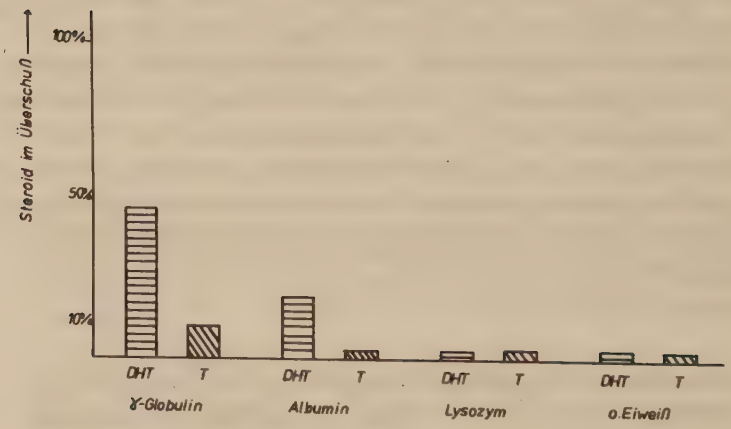

Abb. 26: Bindung von Testosteron und 5-α-Dihydrotestosteron an verschiedene Proteine
Steroide: (1,2^{3}H)-5α-DHT; (1,2^{3}H)-T
Protein (2 mg)ml) = γ-Globulin Rind
Albumin
Lysozym
Trennmethode: Charcoal/Dextran (250 mg/25 mg)

C. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, eine einfache für die Routinebestimmung in der Klinik geeignete chromatographische radioimmunologische Steroid-Bestimmungsmethode aufzubauen, die sich ohne wesentliche Änderung der Methodik auf die Bestimmung anderer Steroide übertragen läßt. Um der Forderung der Einfachheit gerecht zu werden, wurden alle einzelnen methodischen Schritte getrennt untersucht mit dem Ziel, die praktikabelste Lösung zu finden.

Um einen möglichst spezifischen Antikörper zu gewinnen, der eventuell sogar eine chromatographische Vorreinigung überflüssig macht, wurde der Einfluß verschiedener Testosteronantigene, die durch unterschiedliche Kupplungsarten des Testosterons gewonnen wurden (T-3-Glyzinhydrazid-BSA, T-17-Hemisuccinat-BSA, T-7-Carboxyaethylthioäther-BSA), auf Spezifität und Titer der durch Immunisierung von Kaninchen erhaltenen Testosteronantikörper untersucht (S. 13).
Unter den oben angegebenen Testosteronantigenen ist für das von R. Müller für uns entwickelte, leicht zu synthetisierende Antigen - das T-3-Glyzinhydrazid-BSA- erstmals die Hydrazidbindung zur Antigensynthese benutzt worden (S. 13).
Der Vergleich der Spezifität erbrachte keine wesentliche Verbesserung der aus der Literatur bekannten Kreuzreaktionen in Abhängigkeit vom verwendeten Antigen und Immunisierungsverfahren (S. 15).

Weiterhin wurde ein Antigen, das 5α-Dihydrotestosteron-BSA das von R. Müller (Physiol. Chem. Institut Bonn) erstmalig durch direkte Kupplung des Steroids an BSA durch reduktive Aminierung für uns hergestellt worden war, untersucht (S. 18). Es zeigte sich, daß mit dem direkt an

BSA gekuppelten Steroid ein Antikörper erhalten wurde, der sowohl für die Bestimmung von 5α-DHT als auch zur Bestimmung von 3ß-Androstandiol verwendet werden kann (S. 20). Zur Isolierung von 3ß-Androstandiol ist ein chromatographisches Verfahren unter erstmaliger Verwendung von Controlled-Pore-Glass zur Trennung des kreuzreagierenden 3α-Androstandiol an einer Mikrosäule entwickelt worden (S. 21).

Zur chromatographischen Trennung der Steroide wurde eine Kieselgel-Mikrosäule entwickelt, die bei kleiner Dimension und guten Trenneigenschaften gestattet, das organische Extraktionsmittel sofort auf die Säule aufzutragen, ohne das Volumen vorher einzuengen (S. 23). Diese verwendete Mikrosäule hat eine Dimension von 4 x 70 mm oder 4 x 100 mm (S. 29). Mit dieser Mikrosäule ist es möglich, alle auf einer Dünnschicht-Kieselgelplatte erzielbaren Trennungen mit den gleichen Laufmitteln ebenfalls zu erzielen. Unsere Untersuchungen zeigten, daß bei der kleinen Dimension der Säule nur kleine vernachlässigbare Störungen durch Blankwerte auftraten, obwohl die Verwendung von Kieselgel wegen größerer Störfähigkeit bei der radioimmunologischen Bestimmung nur selten gebräuchlich ist (S. 35).

Erstmals wurde von uns als Säulenfüllung zur chromatographischen Trennung poröses Glas verwendet (S. 40), das bei hervorragenden Laufeigenschaften, sehr guten Trenneigenschaften und niedrigen Blankwerten sehr gut geeignet ist, im chromatographischen Radioimmunoassay benutzt zu werden. Für dieses Controlled-Pore-Glass wurden die Lauf- und Trenneigenschaften in Abhängigkeit von der Porengröße, Korngröße, Säulenlänge und Elutionsmittel untersucht und die Verwendungsmöglichkeiten einzelner Spezifitäten von Controlled-Pore-Glass definiert (S. 41). Der Blank von Controlled-Pore-Glass im

RIA nach der Chromatographie ist nicht signifikant höher als der gleich großer Proben ohne Chromatographie. Aus diesem Grund ist die Verwendung von porösem Glas wegen des niedrigen unspezifischen Blanks gerade für den Radioimmunoassay mit Chromatographie von Interesse (S. 59).

Weitere Untersuchungen hatten das Ziel, herauszufinden welchen Einfluß die Trennmethode mit Charcoal/Dextran, Polyethylenglycoll oder Ammoniumsulfat auf die Trennung der freien und antikörpergebundenen Steroidfraktion hat (S. 62).

Bei der Untersuchung des Einflusses der Trennmethode der antikörpergebundenen und freien Steroidfraktion auf die Eichkurve bei der radioimmunologischen Testosteronbestimmung ergibt die Trennung mit Charcoal/Dextran die Eichkurve mit der höchsten Empfindlichkeit, die annähernd erreicht wird durch die Trennung mit Polyethylenglycoll (S. 66). Der erheblich flachere Abfall der Eichkurve bei Verwendung von Ammoniumsulfat mit wesentlich schlechterer Empfindlichkeit ist dadurch erklärt, daß durch Ammoniumsulfat nicht nur spezifisch an Antikörper gebundene Steroide, sondern auch unspezifisch an Globuline gebundene Steroide mit niedrigerer Affinität präzipitiert werden.

Weiterhin konnte ein Einfluß der Verwendung von Charcoal/Dextran, Polyethylenglycoll und Ammoniumsulfat zur Trennung der antikörpergebundenen und freien Steroidfraktion auf das Ergebnis der Titerbestimmung des Antiserums nachgewiesen werden (S. 68). Es konnte dabei festgestellt werden, daß bei Verwendung von Polyethylenglycoll und Charcoal/Dextran als Trennmethode die Ergebnisse der Titerbestimmung in vergleichbarer Größenord-

nung liegen. Die Titerbestimmung unter Verwendung von Ammoniumsulfat zur Trennung der antikörpergebundenen und freien Steroidfraktion war mit der verwendeten Versuchsanordnung nicht möglich, da bei allen Verdünnungsstufen mehr als 50 % des radioaktiven Steroids gebunden ist, was damit erklärt werden muß, daß die Steroide bei Verwendung von Ammoniumsulfat in einem solchen Ausmaß unspezifisch an Globuline gebunden werden, daß die spezifische Bindung bei stärkerer Verdünnung des Antikörpers nicht mehr von Bedeutung ist.

Weitere Untersuchungen wurden durchgeführt zur Prüfung der Stabilität der antikörpergebundenen und freien Steroidfraktion im RIA in Abhängigkeit von der Dauer der Einwirkung von Kohle, Polyethylenglycoll oder Ammoniumsulfat bei der Trennung der gebundenen und freien Fraktion (S. 72). Diese Fragestellung ist gerade in der Klinik bei großem Probenanfall in der Routine von besonderem Interesse. Es konnte gezeigt werden, daß die Dauer der Einwirkung von Polyethylenglycoll und Ammoniumsulfat keinen Einfluß auf die Trennung der gebundenen und freien Fraktion hat, daß sie aber bei Verwendung von Charcoal/Dextran die Größe der gebundenen Fraktion zeitabhängig verringert.

Von Interesse war auch der Einfluß der Temperatur auf die Trennung der freien und antikörpergebundenen Fraktion durch Charcoal/Dextran da nicht alle Arbeitsgänge bei gleicher Temperatur durchgeführt werden können (S. 76). Es zeigte sich, daß eine kurzfristige Erwärmung zu einer mäßiggradigen Erniedrigung der antikörpergebundenen Steroidfraktion führt (s. 77).

Die nächsten Versuche beschäftigten sich mit der Frage-

stellung welchen Einfluß der Zusatz von Proteinen zum radioimmunologischen Inkubationsansatz in Abhängigkeit von der Trennmethode auf die spezifische Bindung des Steroids an seinen Antikörper hat (S. 79). Proteine werden dem radioimmunologischen Inkubationsansatz zugesetzt um 1. eine Adsorption der Steroide am Glas des Inkubationsröhrchens zu verhindern, 2. den Blank zu erniedrigen und 3. eine bessere Ausfällung zu erreichen. Die niedrigste unspezifische Bindung an zugesetzte Proteine tritt bei der Verwendung von Charcoal/Dextran auf, eine nicht zu vernachlässigende hohe bei Ammoniumsulfat (S. 80). Die unspezifische Bindung eines Steroids an Proteine hängt von der Art und der Konzentration des Proteins ab. Da γ-Globulin Rind (Serva) die höchste unspezifische Bindung von Testosteron zeigt, wurden γ-Globuline vom Rind verschiedener Firmen verglichen (S. 80). Es kann nach den Untersuchungen gesagt werden, daß käufliche γ-Globuline eine solche Bindungsfähigkeit für Steroide haben können, daß ihr Zusatz im Inkubationsansatz die Eichkurve mit spezifisch bindenden Antikörpern stört, weswegen die Verwendbarkeit bei der radioimmunologischen Steroidbestimmung vorher überprüft werden muß.

Zuletzt wurde untersucht welchen Einfluß das zugesetzte unspezifische Protein und die Trennmethode der antikörpergebundenen und freien Steroidfraktion auf die Eichkurve eines Steroids mit spezifisch bindendem Antikörper hat (S. 84). Dabei zeigte sich, daß die Verwendung von Ammoniumsulfat als Trennmethode bei allen untersuchten Proteinen Eichkurven mit deutlich schlechterer Empfindlichkeit ergibt als bei Verwendung von Polyethylenglycoll und Charcoal/Dextran. Bei Verwendung von Polyethylenglycoll zur Trennung der antikörpergebundenen und freien Steroidfraktion ergibt Albumin und Lysozym bei niedriger gebundener Fraktion schlechte Eichkurven, während die

weiteren Proteine Eichkurven ergeben, die etwa denen der Trennung mit Charcoal/Dextran entsprechen. Insgesamt zeigte sich, daß die Verwendung von Charcoal/Dextran als Trennmethode unabhängig vom zugesetzten Protein die besten Eichkurven ergibt, wobei nur die Verwendung von δ-Globulin von Rind (Serva) einen signifikant geringeren Abfall der Eichkurve zeigt (S. 85).

Auf Grund der von uns untersuchten Einzelschritte wurde folgende Methodik für die radioimmunologische Steroidbestimmung, z.B. für Testosteron ausgearbeitet:

1. Extraktion aus Plasma

   In einen Spitzkolben werden 0,2 ml Plasma zusammen mit einer Standardmenge (1,2^{3}H)-Testosteron zur Ausbeutebestimmung pipettiert und eine halbe Stunde zur Gleichgewichtseinstellung bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Extraktion der Steroide erfolgt durch Zufügen von 25 ml Dichlormethan/Hexan 50/50 und 15 minütigem Schütteln auf einem Schüttler. Anschließend zentrifugiert man 10 Min. bei 3000 rpm/Min. mit einer Tischzentrifuge (Christ). Die organische Phase wird abpipettiert und direkt zur chromatographischen Trennung über einen Phasentrennfilter auf die Säule aufgetragen.

2. Chromatographische Trennung

   Die chromatographische Trennung wird an einer Mikrosäule (4 x 70 mm) durchgeführt, entweder unter Verwendung von Kieselgel Bio-Sil A (Bio-Rad 200-400 mesh) oder Controlled-Pore-Glass (CPG 10, 200-400 mesh, 118 A). Die Elution erfolgt mit Benzol/Äthylacetat 95/5. Die ersten 10 ml des Eluats werden verworfen und die weiteren 15 ml, in denen Testosteron eluiert wird, aufgefangen und eingedampft.

3. Radioimmunologische Bestimmung

Das eingedampfte Eluat wird in 1 ml Äthanol gelöst. Ein Aliquot von 0,1 ml wird zur Ausbeutebestimmung im Szintillationszähler gemessen. Ein weiterer Aliquot von 0,1 ml wird zur Inkubation in vorbereitete Reagenzröhrchen pipettiert und im Exsikkator eingedampft. Gleichzeitig pipettiert man in vorbereitete Reagenzgläser 0,1 ml einer Eichkurvenreihe, welche 0 bis 1000 pg nicht radioaktives Testosteron enthält und dampft alles unter Vakuum ein. Anschließend gibt man 0,5 ml einer Antikörperlösung mit geeigneter Arbeitsverdünnung hierzu und fügt 0,1 ml einer wässrigen Lösung von (1,2^{3}H)-Testosteron (~ 5000 cpm) zu. Nach einer Inkubationszeit von 24 Std. bei 4° C pipettiert man 0,5 ml einer Charcoal/Dextran Lösung (250 mg/50 mg) hinzu und zentrifugiert nach 10 Min. ab. Die Radioaktivität von 0,5 ml des Überstandes wird in einem Szintillationszähler gemessen.
Berechnung der Werte an Hand der erstellten Eichkurve.

Die hier beschriebene Methodik zur Testosteronbestimmung wurde im Hormonlabor auf ihre Praktikabilität, Wiederfindung und Variation hin untersucht und für die Routinebestimmung in der Mediz. Klinik Marburg eingesetzt. Nach Änderung des Elutionsmittels bei der Chromatographie wurde diese Methode zur Bestimmung weiterer Steroide umgewandelt. (3α-Androstandiol, 5α-DHT, Dihydroepiandrosteron, Aetiocholanolon).

Literaturverzeichnis

1) BERSON, S.A.; YALOW, R.S.:
Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods.
Nature (London) 184 (1959) 1648

2) ERLANGER, B.F.; BOREK, F.; BEISER, S.M.; LIEBERMANN, S.:
Steroid-Protein Conjugates I. Preparation and Characterization of Conjugates of Bovine Serum Albumin with Testosterone and with Cortisone.
J. Biol. Chem. 228 (1957) 713

3) ERLANGER, B.F.; BOREK, F.; BEISER, S.M.; LIEBERMANN, S.:
Steroid-Protein Conjugates II. Preparation and Characterization of Conjugates of Bovine Serum Albumin with Progesterone, Desoxycorticosterone, and Esterone.
J. Biol. Chem. 234 (1959) 1090

4) BEISER, S.M.; ERLANGER, B.; AGATE, F.; LIEBERMANN, S.:
Antigenicity of Steroid-Protein Conjugates.
Science 129 (1959) 564

5) GOODFRIEND, L.; SEHON, A.H.:
Preparation of an Estrone-protein conjugate.
Canad. J. Biochem. Physiol. 36 (1958) 1177

6) MIKHAIL, G.; WU, C.H.; FERIN, M.; VANDE WILE, R.L.:
Radioimmunoassay of Plasma Estrone and Estradiol.
Steroides 15 (1970) 333

7) ABRAHAM, G.E.:
Solid Phase Radioimmunoassay of Estradiol-17ß.
Journal of clinical Endocrinology and metabolism.
29 (1969) 866

8) STECKER, H.G.; ECKERT, H.G.:
Radioimmunoassay - eine Revolution in der Analytik.
Labormedizin GJT, 2 (1978) 106

9) NIESCHLAG, E.; WICKINGS, E.J.:
A review of radioimmunoassay for steroids
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13 (1975) 261

10) MIDGLY, JR.; NISWEND, G.D.:
Radioimmunoassay of Steroides.
Acta Endocrinologica Suppl. 147 (1970) 320

11) VECSEI, P.; GLESS, K.-H.:
Aldosteron-Radioimmunoassay.
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart 1975

12) VAIKUTIS, J.; ROBBIS, J.B.; NIESCHLAG, E.; ROSS, G.T.:
A Method for Producing Specific Antisera with Small
Doses of Immunogen
J. Clin. Endocrin. and Metabolism 33 (1971) 988

13) HANING, R.; Mc CRACKEN, J.; ST. CYR M.; UNDERWOOD, R.;
WILLIAMS, G.; ABRAHAM, C.G.:
The Evolution of Titer and Specifity of Aldosteron
Binding Antibodies in Hyperimmunized Sheep
Steroides 20 (1972) 73

14) FELDMAN, H.; RODBARD, D.:
"Mathematical theory of radioimmunoassay"
Ch. VII, Priciples of competitive Protein-Binding Assay (Odell, W.D.; Daughadany, W. Eds.)
J. B. Lippincott, Philadelphia (1971) pp. 158-173

15) ABRAHAM, G.E.; ODELL, W.D.:
"Solid-Phase RIA of serum estradiol-17ß: A semiautomated approach" Ch. 5,Immunologic Methods in Steroid Determination (Peron, F.G.; CALDWELL, B.V. Eds.)
Appleton-Century-Crofts, New York (1970)

16) ABRAHAM, G.E.:
Solide-Phase radioimmunoassay of estradiol-17 beta.
J. clin. Endocrinol. 29 (1969) 866

17) LINDNER, H.R.; PEREL, E.; FRIEDLANDER, A.; ZEITLIN, A.:
Specifity of antibodies to ovarian hormones in relation to the side of attachment of the steroid hapten to the peptide carrier.
Steroids 19 (1972) 357

18) KUSS, E.; GOEBEL, R.:
Determination of estrogen by radioimmunoassay with antibodies to estrogen-C 6-Conjugates Syntheses of Estrone-,Estradiol-17ß-and Estriol-6-Albumine Conjugates.
Steroids 19 (1972) 509

19) ABRAHAM, G.E.; ODELL, W.D.; EDWARDS, R.; FURDY, J.M.:
"Solid-Phase Radioimmunoassay of estrogens in biological fluids". Steroid Assay by Protein Binding
(Proc. Conf. Geneva 1970) (Diczfalusy, E. Ed.)
Karolinska Institutet(1970

20) DEVILLA, G.O.; ROBERTS, K.; WIEST, W.G.; MIKHAIL, G.; FLICKINGER:
A Spezific Radioimmunoassay of Plasma Progesterone
J. Clin. Endocrinol. Metab. 35 (1972) 458

21) KUTAS, M.; CHUNG, A.; BARTOS, D.; CASTRO, A.:
"A simple Progesterone RJA without columne Chromatography"
Steroids 20 (1972) 697

22) MARTIN, B.T.; NUGENT, C.A.:
"Non-chromatographic RJA for Plasma Aldosterone".
Steroids 21 (1973) 169

23) GOMEZ-SANCHEZ, C.; KEM, D.C.; KAPLAN, M.M.:
"A RJA for Plasma Aldosterone by immunologic Purification".
J. Endocrinol. Metab. 36 (1973) 795

24) FARMER, R.W.; ROUP, W.G. JR.; PELLIZZARI, E.D.:
"A Rapid Aldosterone RJA".
J. Clin. Endocrinol. Metab. 34 (1972) 18

25) ABRAHAM, G.E.; CHIEF, M.D.:
Radioimmunoassay of Steroids in biological materials.
International Atomic energy agency
Symposium on Radioimmunoassay and related procedures
in clinical medicine and research
Istanbul, Turky, 10-14 Sep. 1973 (1-33) IAEA-SM-177/207

26) BINOUX, M.A.; ODELL, W.D.:
Use of Dextran-Coated Charcoal to separate Antibody-bound
from Free Hormone: A Critique
J. Clin. Endocrin. 36 (1973) 303

27) FARMER, R.W.; FABRE, L.F.; PIERCE, CH. E.:
Comparison a Simple Radioimmunoassay (RIA) of Cortisol (F) with Competitive Protein Binding.
Clin. Res. 22 (1974) 339

28) MAYES, D.; FURUYAMA, S.; KEM, D.C.; NUGENT, C.A.:
A Radioimmunoassay for Plasma-Aldosteron.
J. Clin. Endocrin. 30 (1970) 682

29) Mc CAA, C.S.; SULYA, LL:
Pathways of Excretion of 1^3H-1,2-d-Aldosterone Radiometabolites in the Rat.
Endocrinology 79 (1966) 815

30) QUABBE, H.J.:
Round Table on Prospects of RIA of Human Growth Hormone and Parathormone.
In "Labelled Proteins in Tracer Studies"
(Donato L. Mihaud, G. and Sirchis, J. Eds.)
Euratom, Brussels (1966) 266

31) MÜLLER, R.; SCHEUER, A.; GERDES, H.:
Glycinhydrazid als bifunktionelles Reagenz zur Synthese von Antigenen mit Steroiden als immundeterminante Gruppen.
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 357 (1976) 1007

32) GROSS, S.Z.; CAMPELL, D.H.; WEETALL, H.H.:
Production of antisera to steroids coupled to proteins directly through the phenolic A-ring.
Immunochemistry 5 (1968) 55

33) PIRKE, K.M.:
A Comparison of three methods of measuring testosteron in plasma: Competitive Protein Binding, Radioimmunoassay without chromatography and Radioimmunoassay including thin layer Chromatography.
Acta Endocrinol. 74 (1973) 168

34) VERMELEN, A.; VERDOUCK, L.:
Radioimmunoassay of 17ß-hydroxy-5 α-androstan-3-one adrosten 3,17 dione; dehydroepiandrosterone, 17-hydroxyprogesteron and its application to human male plasma.
J. Steroid. Biochem. 7 (1976) 1

35) MÜLLER, R.; SCHEUER, A.; GERDES, H.:
New antigenes with steroids as the immunodeterminant group: Coupling of 5 α-DHT to bovine serum albumin by reductive amination.
Acta endocrinol. Suppl. 87 (1978) 215

36) HERMANDEZ, J.; AXELROD, L.R.:
Chromatographic separation of the steroids from the total lipid extracts.
Analytical Chemestry 35 (1963) 80

37) ANDERSON, P.H.; FUKUSHIMA, K.; SCHILLER, H.S.:
Radioimmunoassay of Plasma Testosterone, with use of Polyethylen Glycol to Separate Antobody-Bound and Free Hormone.
Clinical Chemestry 26 (1975) 708

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Dr. med. A. Scheuer für die Überlassung des Themas bedanken.

Herrn Professor Dr. med. H. Gerdes danke ich für die Arbeitsmöglichkeiten in seinem Labor und die Übernahme des Referates.

Besonders danke ich Herrn W. Dietz für die Anfertigung der Fotografien.

Lebenslauf

Name:	Christa Hagen-Aukamp, geb. Hagen
geboren:	9. März 1949 in Limburg/Lahn
Eltern:	Josef und Hildegard Hagen Einzelhandelskaufleute in Limburg
Geschwister:	zwei Brüder, eine Schwester
Schule:	Volksschule Limburg, von 1955 bis 1959 Realschule Camberg/Hessen von 1959 bis 1965 Gymnasium Tilemannschule Limburg, mathematisch-naturwissenschaftliche Abt. von 1965 bis zum Abitur 18. Juni 1968
MTA-Ausbildung:	Krankenpflegepraktikum 1.9. bis 30.11.1968 Vorpraktikum im Zentrallabor 1.12.1968 bis 12.4.1969, St. Vincenz-Hospital, Limburg ab 15.4.1969 MTA-Ausbildung, Lehranstalt für med.-Techn. Assistentinnen, Marburg, Examen 19.3.1971 Anerkennungspraktikum MTA, Behringwerke Marburg, Abt. Gerinnungslabor 15.4.1971 bis 15.10.1971
Studium:	Medizinstudium ab WS 71 an der Philipps-Universität Marburg
Prüfungen:	Naturwissenschaftliche Vorprüfung 19.9.1972 Ärztliche Vorprüfung 6.9.1973 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 25.3.1975 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 26.8.1976 Ärztliche Prüfung 18.4.1978 Approbation als Ärztin 15.6.1978

Seit 15.8.1978 wissenschaftliche Angestellte des Physiol.-Chem. Institutes II, Abteilung Neurochemie, der Universität Marburg.

Marburg, Juni 1979

Meine akademischen Lehrer waren die Herren und Frauen Professoren und Dozenten in Marburg:

Amon, Arndt, Baltzer, Bode, Braasch, Buchholz, Castenholz, Daume, Dennhardt, Dittrich, Dombrowski, Doss, Egbring, Ehrhardt, Eißner, Eschenbach, Exner, Friederich, Gallwitz, Ganz, Gerdes, Golenhofen, Goßmann, Graul, Grundner, Haberich, Habermehl, Hamelmann, Hardewig, Havemann, Heene, Hensel, Hering, Hess, Hildebrandt, Hilgermann, Hort, Huch, Ihm, Jakob, Joseph, Kaffarnik, Kalbfleisch, Karlson, Kessler, Klaus, Klein, Kleine, Kleinsasser, Knauff, Koch, Koransky, Knoll, Kuni, Lange, Lauer, Lehmann F.-G., Linneweh, Lorenz, Ludwig, Lütcke, Mannheim, Maroske, Martini, Massarrat, Müller K.H., Neurath, Niemeyer, Oepen I., Petry, Pohlen, Portig, Pots, Priebe, Riecken, Rodeck, Rohen, Schachtschabel, Schaumlöffel, Schiff, Schmidt M., Schmitz-Moormann, Schneider, Schulte-Hermann, Schwick, Seifart, Sekeris, Siegert, Siegrist, Slenczka, Sodomann, Solcher, Straub, Sturm, Stutte, Weber, Welge-Lüssen, Wendt, Wesemann, Wiegandt, Willenbockel.